

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2022

Michaela Klozová

FAKULTA ZDRAVOTNICKÝCH STUDIÍ

Studijní program: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

Michaela Klozová

Studijní obor: Laboratorní diagnostika ve zdravotnictví B0914P360004

**Plazma vaječného žloutku jako alternativa k séru
v kultivačních médiích**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: MUDr. Vlastimil Kulda, Ph.D.

PLZEŇ 2022

Na této stránce je vloženo zadání bakalářské práce.

Na této stránce je vloženo zadání bakalářské práce.

Čestné prohlášení:

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a všechny použité zdroje jsem uvedla v seznamu literatury a použitých zdrojů.

V Plzni dne 20. 3. 2022

.....

vlastnoruční podpis

Poděkování:

Děkuji MUDr. Vlastimilu Kuldovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce, poskytování cenných rad a podkladů. Dále děkuji Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Plzni za poskytnutí prostor a potřebných materiálů k zrealizování mé praktické části. Dále děkuji Mgr. Janě Dvořákové, Ph.D., Ing. Lucii Wiesnerové, a MUC. Jaroslavovi Benešovi za pomoc s vypracováním praktické části.

Anotace

Jméno a příjmení: Michaela Klozová

Katedra: Katedra záchranářství, diagnostických oborů a veřejného zdravotnictví

Název práce: Plazma vaječného žloutku jako alternativa k séru v kultivačních médiích

Vedoucí práce: MUDr. Vlastimil Kulda, Ph.D.

Počet stran – číslované: 41

Počet stran – nečíslované: 34

Počet příloh: 3

Počet titulů použité literatury: 13

Klíčová slova: buněčné kultury, kultivační média, fetální bovinní sérum, plazma vaječného žloutku, MG-63, testy proliferace

Souhrn:

Buněčné kultury se rutinně používají v řadě laboratoří a jsou jedním z hlavních nástrojů výzkumu v biomedicínských vědách. Kultivační média umožňující proliferaci eukaryotických buněk mají velmi komplexní složení. Pro kultivaci většiny buněk je třeba k základnímu složení přesně definovaného média doplnit ještě chemicky nedefinovanou složku, jíž je standardně fetální bovinní sérum (FBS). Nevýhodou FBS je jeho cena, ale i etické otázky spojené s jeho získáváním. Cílem této práce bylo ověření možnosti využít plazmu vaječného žloutku (EYP) jako alternativu k FBS v kultivačním médiu.

Práce má část teoretickou a praktickou. V teoretické části jsou popsány základy kultivace buněk, kultivační média, etické problémy spojené se získáváním FBS. Diskutovány jsou možnosti náhrady FBS s důrazem na EYP. Experimentální část se zabývala optimalizací přípravy EYP a hodnocením viability a proliferace MG-63 buněk kultivovaných v médiu s EYP místo FBS.

Pro udržení viability buněčné linie byla zjištěna optimální koncentrace EYP v kultivačním médiu 50 %. Ukázali jsme, že buněčnou linii MG-63 je sice možné pěstovat v kultivačním médiu s přídavkem EYP místo FBS, ale proliferace buněk dosahovala pouze 30 % ve srovnání se standardním médiem s FBS.

Anotation

Surname and name: Michaela Klozová

Department: Department of paramedical science, medical diagnostics studies and public health

Title of thesis: Egg yolk plasma as an alternative to serum in culture media

Consultant: MUDr. Vlastimil Kulda, Ph.D.

Number of pages -numbered : 41

Number of pages- unnumbered: 34

Number of appendices: 3

Number of literature items used: 13

Key words: cell cultures, culture media, fetal bovine serum, egg yolk plasma, MG-63, proliferation assays

Summary:

Cell cultures are routinely used in a number of laboratories and are one of the main research tools in the biomedical sciences. Culture media enabling the proliferation of eukaryotic cells have a very complex composition. For the cultivation of most cells, it is necessary to add a chemically undefined component to the basic composition of a precisely defined medium, which is usually fetal bovine serum (FBS). The disadvantage of FBS is its price, but also the ethical issues associated with its harvesting. The aim of this work was to verify the possibility of using egg yolk plasma (EYP) as an alternative to FBS in the culture medium.

The bachelor thesis consists of a theoretical and an experimental part. The theoretical part describes the basic principles of cell culture, culture media, ethical issues associated with obtaining FBS. Possibilities of FBS replacement with emphasis on EYP are discussed. The experimental part dealt with the optimization of EYP preparation and evaluation of viability and proliferation of MG-63 cells cultured in medium with EYP instead of FBS.

To maintain the viability of the cell line, the optimal concentration of EYP in the culture medium was found to be 50%. We have shown that the MG-63 cell line can be grown in culture medium supplemented with EYP instead of FBS, but cell proliferation was only 30% compared to standard medium with FBS.

PŘEDMLUVA

Téma této bakalářské práce jsem si zvolila především díky zájmu o biochemii již na střední škole. Společně se svým vedoucím práce jsem vybrala téma pro mě velice atraktivní, konkrétně 'Plazma vaječného žloutku jako alternativa k séru v kultivačních médiích'. Naše výsledky by mohly přispět k modernizaci postupů kultivace buněk. Součástí této bakalářské práce i praktická část, ve které kultivujeme buňky v plazmě vaječného žloutku místo FBS.

OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ	12
SEZNAM GRAFŮ	12
SEZNAM TABULEK	13
ÚVOD.....	15
TEORETICKÁ ČÁST	16
1 ZÁKLADY KULTIVACE BUNĚK	16
1.1. Historie	16
1.2. Potřebné vybavení	17
1.2.1 Laminární box	17
1.2.2 Inkubátor	18
1.2.3 Inverzní mikroskop	19
1.2.4 Ostatní vybavení	20
1.3 Průběh kultivace	20
1.3.1 Pasážování	20
2 KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	23
2.1 Typy kultivačních médií.....	23
2.2 Kultivační média z hlediska složení	23
2.2.1 Voda a anorganické látky.....	24
2.2.2 Organické látky	24
2.2.3 Další doplňky.....	25
2.2.4 Antibiotika	25
2.3 Udržení pH	26
3 FETÁLNÍ BOVINNÍ SÉRUM.....	28
3.1. Základní informace a složení.....	28
3.2 Způsob získávání	28
3.3. Problémy užití	30
3.4. Regulační podněty	30
3.5. Náhrady FBS	30
4 VÝVOJ, VLASTNOSTI A CHEMICKÉ SLOŽENÍ VEJCE.....	32

4.1. Vývoj žloutku	32
4.2. Vlastnosti	32
4.3. Chemické složení žloutku.....	33
5 BUŇKY MG 63	36
6 METODA CCK-8.....	37
PRAKTICKÁ ČÁST	39
7 CÍL A ÚKOLY PRÁCE	39
7.1 Hlavní cíl	39
7.2 Dílčí cíle	39
8 HLEDÁNÍ OPTIMÁLNÍ KONCENTRACE.....	40
8.1. Zahájení práce s buňkami MG-63	40
8.2. Příprava 3 druhů médií	41
8.3. Pilotní pokus - kultivace v médiu s plazmou vaječného žloutku bez úpravy pH. 42	
8.4 Kultivace v médiu s plazmou vaječného žloutku s úpravou pH	44
8.4.1 Příprava EYP.....	44
8.4.2 Testování cytotoxicity EYP	45
8.5. Testování nejvhodnější koncentrace plazmy vaječného žloutku v médiu.....	47
8.6. Dlouhodobá kultivace v DMEM médiu s 50 % EYP	53
DISKUZE	54
ZÁVĚR.....	55
SEZNAM LITERATURY.....	56
SEZNAM PŘÍLOH	58

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Laminární box	18
Obrázek 2: Inkubátor zvenku a zevnitř	19
Obrázek 3: Inverzní mikroskop.....	19
Obrázek 4: Schéma udržení pH	27
Obrázek 5: Průběh získávání fetálního bovinního séra	29
Obrázek 6: Složení vejce.....	35
Obrázek 7: Srovnání CCK-8 s jinými metodami	37
Obrázek 8: Čtečka destiček	38
Obrázek 9: Pilotní pokus – obsah jamek na destičce	43
Obrázek 10: Výsledky po první kultivaci.....	44
Obrázek 11: Testování cytotoxicity EYP – obsah jamek na destičce	46
Obrázek 12: Snímky MG-63 buněk kultivovaných v médiu s různým obsahem EYP	49
Obrázek 13: DMEM + 10 % EYP	49
Obrázek 14: DMEM + 20 % EYP	50
Obrázek 15: DMEM + 30 % EYP	50
Obrázek 16: DMEM + 40 % EYP	50
Obrázek 17: DMEM + 50 % EYP	51
Obrázek 18: DMEM + 60 % EYP	51
Obrázek 19: DMEM + 70 % EYP	51
Obrázek 20: DMEM + 80 % EYP	52
Obrázek 21: DMEM + 90 % EYP	52
Obrázek 22: DMEM + 100 % EYP	52
Obrázek 23: pozitivní kontrola	53
Obrázek 24: negativní kontrola	53

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Růstový cyklus buněk	22
Graf 2: Hledání optimální koncentrace EYP v médiu	48

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Doplnky základních kultivačních médií.....	26
Tabulka 2: Chemické složení slepičího vejce.....	33
Tabulka 4: Pozitivní kontrola: DMEM + FBS.....	41
Tabulka 5: Negativní kontrola: DMEM.....	41
Tabulka 6: Médium s plazmou vaječného žloutku: DMEM + YEP.....	41
Tabulka 7: Výsledky po 24 hodinách kultivace.....	43
Tabulka 8: Výsledky po 60 hodinách kultivace.....	43
Tabulka 9: Mikroskopická kontrola po 24 hodinách kultivace.....	46
Tabulka 10: Mikroskopická kontrola po 48 hodinách kultivace.....	46
Tabulka 11: Schéma pokusu – hledání optimální koncentrace EYP.....	47
Tabulka 11: Naměřené hodnoty metodou CCK-8.....	48

SEZNAM ZKRATEK

BME	Eaglovo médium
CCK-8.....	set na počítání buněk
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DMEM.....	Dulbeccova modifikace Eaglova média
EYP.....	plazma vaječného žloutku
FBS	fetální bovinní sérum
MEM	minimální esenciální médium
MG-63	buněčná line MG-63
NADH.....	nikotinamidadeninindinukleotid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, kultivační médium

ÚVOD

Důvodem k napsání této bakalářské práce je pokusit se přispět k modernizaci postupu kultivace buněk. Kultivační média umožňují proliferaci neboli růst eukaryotických buněk. V současné době se ke kultivačním médiím přidává ještě doplňková složka FBS - fetální bovinní sérum v přesně definovaném poměru. Tento přídatek poskytuje buněčným kulturám potřebné hormony, růstové faktory, vazebné a transportní proteiny a další stopové prvky, které jsou nezbytné pro růst buněk. Proteiny z FBS mají i puřovací a detoxikační roli, důležité jsou i inhibitory proteolytických enzymů, které brání rozpadu proteinů důležitých pro udržení viability buněčné populace. Značnou nevýhodou séra je jeho cena, odlišnost jednotlivých šarží, ale především etické spory, a to hlavně kvůli způsobu odběru.

Nyní je sice snaha nahradit FBS jednotlivými růstovými faktory a purifikovanými proteiny, ale ta jsou velmi drahá a zatím umožňují kultivaci pouze některých buněčných linií.

Za jednu z možných alternativ k séru je v některých studiích uváděná plazma vaječného žloutku. Ta je součástí žloutku, lze jí však oddělit centrifugací. Následně je nutná další úprava plazmy, aby bylo možné ji použít. Tato bakalářská práce se tedy bude věnovat použití plazmy jako možné alternativy k FBS a také procesu kultivace buněk krok po kroku.

TEORETICKÁ ČÁST

1 Základy kultivace buněk

1.1. Historie

První pokusy o kultivaci buněk sahají na začátek dvacátého století, kdy ke kultivaci byly využívány tkáně žáby. Tyto kultivace nebyly příliš náročné na podmínky, jelikož žáby jsou studenokrevní živočichové, tudíž kultivace nevyžadovala inkubaci při přesné teplotě. Kromě toho se mohlo využívat i jejich vyšší přirozené schopnosti regenerace oproti vyšším živočichům.

Další pokusy se prováděly již s teplokrevnými organismy, ideální se jevílo použití kuřecí embryo hlavně díky rozmanitosti tkání, které bylo možné získat. Zcela zásadní byl rozvoj používání myši jako modelových zvířat v genetice. K tomuto došlo v 30. letech 20. století.

Lidské tkáňové linie se tak vyvinuly na základě objevů, které se uskutečnily na podkladě nádorových buněčných linií, zejména tzv. HeLa linie. HeLa buňky byly izolované z nádoru děložního hrdla. Buňky nesou jméno podle ženy, která zemřela na toto nádorové onemocnění. Jmenovala se Henrietta Lacksová.

V 60. letech se začaly kultivovat i klasické nenádorové lidské buněčné linie. Odvětví, které také nesmírně přispělo k rozvinutí kultivačních technik, byla transplantační imunologie. Náročnost kultivace lidských buněk také pomohla k vytvoření celé řady pomůcek a přístrojů jako například laminárních boxů, CO₂ inkubátorů a dalšího vybavení, které bude podrobně popsáno v následujících kapitolách. Tyto přístroje nesmírně přispěly k rozvoji kultivace i v globálním měřítku.

Během 70. a 80. let se začínaly uplatňovat další postupy z genetiky. Mluvím především o transfekci. Komplexní obraz o dějích v buňce nám také genová exprese, replikace DNA nebo také přenos signálu. Tyto objevy nám slouží jako nástroj komplexních dějů a otevírají tak celou řadu dalších možností aplikace.

Díky molekulárně-biologickým metodám jsme nyní schopni i kultivace tak náročných buněčných kultur jako jsou například buňky získané z plodové vody. Toho využíváme

především v prenatální diagnostice k odhalení některých dědičných onemocnění. (*Hatina, J., Kripnerová, M., 2014*)

1.2. Potřebné vybavení

Základem pro úspěšnou kultivaci eukaryotických buněk je speciálně vybavená laboratoř. To hlavní, o co nám jde, je dodržení přísných podmínek během celé kultivace. V první řadě je to sterilita práce a prostředí. Proto hlavní součástí takovéto laboratoře je laminární box. Uvnitř najdeme všechny potřebné pomůcky, jako jsou stojánky, pipety, špičky a v neposlední řadě nádoba na odpad. Vše je samozřejmě řádně desinfikováno. (*Hatina and Kripnerová, 2014*) Kromě laminárního boxu potřebujeme i inkubátor s přívodem CO₂, který zajišťuje buněčným liniím ideální podmínky pro růst. V neposlední řadě je nedílnou součástí kultivační laboratoře také inverzní mikroskop. Ten používáme hlavně ke sledování růstu buněčné linie nebo ke kontrole případné kontaminace buněk. Dále je také nutné, aby pracovník, který bude pracovat s tkáňovými kulturami, byl řádně vyškolen.

1.2.1 Laminární box

V laminárním boxu se snažíme provádět veškerou manipulaci s buněčnými liniemi. Je konstruován tak, aby co nejvíce zabránil kontaminaci linie ze vzduchu. Vzduch je nejdříve nasáván průduchy, které jsou v dolní části laminárního boxu v místě otvoru na ruce. Vzduch je vháněn dovnitř boxu, kde nejdříve je před kontaktem s pracovním plochou prohnán přes speciální filtry, které zbaví vzduch od všech částic větších než 300 nm s účinností 99,97 %. K zachování sterility přispívá i rutinní desinfekce celé pracovní plochy 70% alkoholem a pravidelné používání germicidní lampy, která je pevná součástí boxu.

Obrázek 1: Laminární box



Zdroj: vlastní

1.2.2 Inkubátor

Tento přístroj má co možná nejpřesněji simulovat optimální podmínky pro kultivaci. Ideální teplota pro kultivaci většiny buněk je 37 °C. Nejčastěji se v současné době používají dvouplášťové inkubátory. Vzduch je rovněž očišťován díky filtrům, které se používají i v laminárním boxu. Dále je vzduch topnými tělesy ohříván. Ve spodní části inkubátoru je umístěna nádržka s vodou, která zajišťuje potřebnou vlhkost. Ta se pohybuje kolem 90 %. Aby se zamezilo množení mikroorganismů, je možnost umístit do nádržky modrou skalici, která je pro mikroorganismy toxická a má tu výhodu, že se neodpařuje spolu s vodou, aby přestoupila do prostoru, kde jsou umístěny jednotlivé buněčné linie. Množení mikroorganismů se předchází i pravidelným dekontaminováním. Do inkubátoru je také připojen zdroj plynu, zpravidla to bývá oxid uhličitý, který je dovnitř vháněn ve stabilní koncentraci 5–10 %. Přítomnost tohoto plynu napomáhá udržení stálého pH, kdy přítomnost CO₂ brání rozpadu NaHCO₃, který se významně podílí na hodnotě pH. Z tohoto důvodu nejsou nádoby s kulturami hermeticky uzavřeny, oxid uhličitý tak může pronikat k samotnému médiu.

Obrázek 2: Inkubátor zvenku a zevnitř



Zdroj: vlastní

1.2.3 Inverzní mikroskop

Používáme ho na monitorování míry konfluence a odhalování kontaminace. Zvláštnost tohoto mikroskopu je ta, že na rozdíl od standardního rozložení, objektiv směřuje na kultivační nádobu ze spodu. Objektiv je tak blízko lahvičky, že plní funkci podložního sklička a není tedy nutné s buněčnou kulturou nijak manipulovat. Což výrazně snižuje riziko kontaminace.

Obrázek 3: Inverzní mikroskop



Zdroj: vlastní

1.2.4 Ostatní vybavení

Toto vybavení už nepatří mezi to nezbytně nutné. Pouze nám usnadňuje další práci, jako je především získání potřebných dat o buněčné kultuře. Existují inkubátory, které mají v sobě zabudovanou kameru a je tak možné je neustále monitorovat. Značné zjednodušení přinášejí také automatické počítače, které dokáží vyhodnotit například míru zastoupení živých buněk. Nemůžu vynechat ani průtokový cytometr, který nejenže dokáže rozlišit buňky na základě tvaru a velikosti, ale po vhodném označení nám cytometr dokáže buňky roztrždit. (Šebek, 2018)

1.3 Průběh kultivace

Většina tkáňových kultur roste jako adherentní buněčné kultury, což znamená, že k tomu, aby proliferovaly, potřebují pevnou plochu, na kterou mohou přisednout. V našem případě tak slouží dno kultivační lahvičky. Princip je takový, že jednotlivé buňky přisednou na dno lahvičky a začnou tvořit souvislou vrstvu buněk. Proto je nutné pravidelně kontrolovat míru proliferace. Nutná je i pravidelná výměna média, buňky v jednom médiu vydrží růst pouze omezenou dobu. Jakmile se vytvoří souvislá vrstva buněk, další proliferace již většinou není možná. Musíme buněčnou populaci rozdělit na několik menších - pasážování.

1.3.1 Pasážování

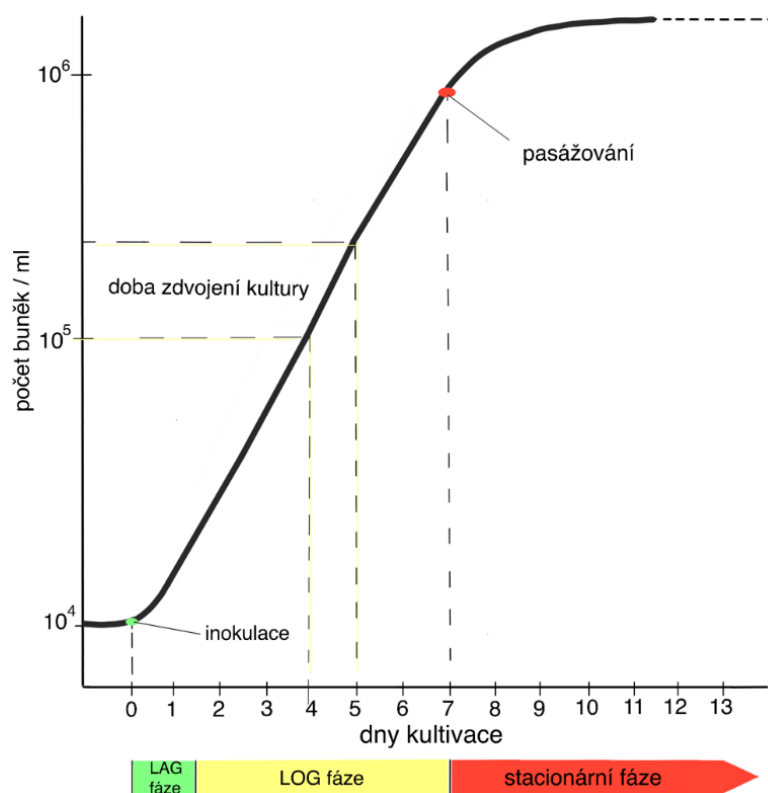
Základem je opatrně uvolnit přisedlé buňky. Do buněčné suspenze přidáme štěpící směs trypsinu a EDTA v PBS. Následuje inkubace 5 – 10 minut při 37°C. Doba inkubace je variantní. Míru rozvolnění můžeme pozorovat pod mikroskopem. Jakmile je rozvolnění buněk dostatečné, musíme účinek enzymu inhibovat. Toho docílíme přidáním média DMEM, kde jsou obsaženy inhibitory proteolytických enzymů (antitrypsin). Následně suspenzi centrifugujeme, aby nám na dně zkumavky vznikla peleta buněk. Supernatant odsajeme. Dále se pracuje pouze s buňkami. Toto je základní schéma pasážování buněk. Je možná celá řada modifikací. Ta vychází především s ohledem na přesný typ buněčné linie. Každá buněčná linie je odlišná a je tak nutné modifikovat některé prvky pasážování především délku inkubační doby s trypsinem. (Hatina, J., Kripnerová, M., 2014)

1.3.2 Růstový cyklus buněk

Jak je patrné již z názvu, kultivace buněk probíhá v neustále se opakujících cyklech. V jednotlivém cyklu máme několik základních fází. První z nich je tzv. fáze prodlevy růstu – lag fáze. V této fázi si buňky zvykají na nové podmínky, jako je třeba výměna média nebo založení celé kultivace. Buňky musí během této fáze přisednout na dno a rozprostřít se. V případě, že předchozí krok obsahoval pasážování pomocí trypsinu, musí se buňky poškozené účinkem tohoto enzymu obnovit.

Po lag fázi přichází fáze exponenciálního růstu neboli log fáze. Na této fázi se podílí 90 – 100 % buněk v kolonii. Tato fáze je nejvhodnější pro experimenty s buňkami. Buňky se rychle množí až do chvíle, kdy je plocha, ke které jsou přisedlé, celá pokryta buňkami. V této chvíli se růst zastavuje a buněčná populace přechází do stavu konfluence neboli stavu slévající se kolonie. Velmi prudce klesá mitotická aktivita. Buněk, které jsou schopné se dělit, je nyní okolo 10 %. Růst buněk se dostává do závěrečné fáze, tzv. fáze stacionární. Klesá pohyblivost buněk, také se vyhlazuje buněčná membrána a buňky se navzájem orientují. V tomto okamžiku je potřeba vyměnit médium, právě vyčerpání potřebných živin je také jeden z důvodů, proč buněčná kolonie už dále neproliferuje. S výměnou média se pojí i pasážování buněk do dalších inkubačních lahvíček, aby byly opět zajištěné optimální podmínky pro růst. Typické je pro tuto fázi také obnovení syntézy specializovaných proteinů, jejichž exprese byla zastavena v lag fázi, kdy jich nebylo potřeba. (*Hatina, J., Kripnerová, M., 2014*)

Graf 1: Růstový cyklus buněk



Převzato a upraveno od: Hatina, J., Kripnerová, M., 2014

2 Kultivační média

2.1 Typy kultivačních médií

Kultivační média jsou jednou ze základních podmínek pro úspěšnou kultivaci jakýkoliv buněk. Mají za sebou určitý vývoj složení a v současné době jich existuje kolem stovky. Na začátku byla kultivační média na bázi embryonálního extraktu, používaly se proteinové hydrolyzáty nebo také lymfa. Což ještě nelze nazývat jako chemická kultivační média v pravém slova smyslu.

Většina kultivačních médií byla definována v 50. letech dvacátého století. Patří mezi ně i bazální Eaglovo médium (BME). To bylo používáno pro kultivaci myších buněčných linií. Šlo hlavně o to najít minimální množství komponent, aby byly buňky schopné proliferace.

Dalším médiem je tzv. médium MEM - minimální esenciální médium. To už sloužilo pro kultivaci lidských buněk. Klade se důraz především na zastoupení jednotlivých aminokyselin, které má být podobné poměru v lidských proteinech. Existují určité modifikace, jednou z nich je Dulbeccova modifikace – DMEM (Dulbecco 's modification of minimal essential), což v překladu znamená Dulbeccova modifikace Eaglova média. Další modifikací je α MEM. Jiným médiem je RPMI. To se používá vesměs pro kultivaci suspenzních buněčných linií.

V současné době jsou tato média používána při kultivaci nejrůznějších buněčných linií. Jsou ale doplňována o FBS v různé koncentraci většinou 5 – 20 %. Je snaha o nahrazení tzv. bezsérovými médii. Ta ale s sebou nese určité problémy. Bezsérová média jsou mnohem komplexnější, musí se doplnit hormony a rozsah použití u jednotlivých buněčných linií je značně omezen. Také z hlediska samotné kultivace se jedná o poněkud náročnější proces. (*Hatina, J., Kripnerová, M., 2014*)

2.2 Kultivační média z hlediska složení

Kultivační média hrají zcela zásadní roli, mají za úkol co nejvíce napodobit složení intersticiální tekutiny organismu, ze kterého pocházejí. Jakmile mají buňky vhodné médium, jsou schopné proliferovat in vitro. Médium obsahuje tyto základní složky: minerály, anorganické soli, sacharidy, aminokyseliny, hydrofilní vitamíny a v některých případech také mastné kyseliny a lipidy. Toto složení médií je standardizované a nepředstavuje žádný

problém. Pro zachování proliferace buněk je ale nutné k většině médií přidat další doplňky. Tyto doplňky nám obohacují médium o velmi důležité složky, bez kterých by nebyla kultivace možná. Mluvím hlavně o stopových prvcích, mastných kyselinách, lipofilních vitamínech, hormonech a také cytokinech, nejdůležitější z nich jsou růstové faktory. Obvyklým zdrojem těchto látek je krevní sérum, což je velice komplexní tekutina, jejíž přesné složení není ani v současné době zcela přesně známé. Právě přidavek těchto složek nám již nedává standardizované složení finálního kultivačního média.

2.2.1 Voda a anorganické látky

Základním rozpouštědlem pro přípravu kultivačních médií je voda. Důležitá je optimální koncentrace anorganických iontů (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^-). Ovlivňuje jak metabolismus jednotlivých buněk, tak například i intracelulární distribuci vody. Je tedy jasné, že musíme řešit hodnotu osmolality. Velmi tady záleží na typu buněk, pro které je médium určeno. Pro lidské buňky je optimální hodnota 290 mmol/kg. V případě, že kultivujeme buňky pocházející ze zvířete, orientujeme se podle velikosti. U menších zvířat volíme vyšší osmolalitu, optimální hodnota je 310 mmol/kg, u vyšších zvířat naopak nižší.

Obecně ale platí, že všechny živočišné buňky tolerují 10% odchylku. Proto komerčně dodávaná mají univerzální hodnotu osmolality stanovenou na 300 mmol/kg. Jen ve velmi ojedinělých případech musíme před zahájením kultivace přejít k úpravě osmolality.

2.2.2 Organické látky

V této kapitole nás zajímají především sacharidy, lipidy, aminokyseliny i peptidy. Jsou totiž hlavním zdrojem živin pro buňky a mají i regulační funkce. Většina těchto látek se přidává již do samotných médií. Některé z nich je ale třeba dodat těsně před kultivací, z důvodu krátké doby stability.

Nejvýznamnější složkou je určitě D-glukóza společně s neesenciální aminokyselinou, L-glutaminem. V běžných médiích máme koncentraci glukózy 1 g/l. V některých médiích může být tato koncentrace až 4,5 g/l. Při vyšších hladinách glukózy musíme brát v potaz skutečnost, že i při dostatku kyslíku vytváří buňky určité procento laktátu, který okyseluje rychleji médium. Proto je z hlediska udržitelnosti lepší používat média s nižším obsahem glukózy. U L-glutaminu je riziko takové, že i v originálně zabalených lahvích s médiem

se volně rozkládá na konečný produkt, kterým je amoniak. Ten je nebezpečný z důvodu toxicity a také zbytečně navyšuje hodnotu pH. Toto bylo vyřešeno tím, že je L-glutamin přidáván těsně před samotnou kultivací, nebo ho výrobce nahradí jeho stabilnější formou. Účinný se zdá být dipeptid složený ze dvou glutaminů (komerčně dostupný jako tzv. Ultraglutamin) nebo je glutamin konjugován s jinou aminokyselinou, tou může být alanin nebo glycin.

2.2.3 Další doplňky

V následující tabulce je přehled možných doplňků základních kultivačních médií. Mezi ty nejdůležitější patří fibronectin, ten je důležitý hlavně pro buňky adherentního typu. V log fázi napomáhají přilnutí buněk. Albumin zvyšuje viskozitu média. To napomáhá překonávat mechanický stres, kterému jsou buňky často vystavovány. Mimo jiné má také protektivní funkci, vytváří s některými složkami komplexy a brání tak jejich předčasnému odbourávání. Důležité jsou také inhibitory proteáz. Ty zastavují účinek trypsinu, čehož využíváme při pasážování. Ani hormony nejsou bezvýznamné. Klasický růstový hormon spolu s hydrokortizolem stimuluje mitózu a i diferenciaci. Inzulin pak napomáhá prostupu glukózy a dalších látek přes membránu buněk. (*Šebek, 2018*)

2.2.4 Antibiotika

Na začátku je podstatné říci, že se snažíme nepoužívat antibiotika rutinně, ale pouze v případech, kde je to má své opodstatnění. K ošetření antibiotiky přistupujeme v případě, kdy chceme kultivovat buňky odebrané přímo z organismu a hrozí tak vážné riziko kontaminace. Po určité době by ale měla následovat výměna média. Nové médium už by mělo být bez antibiotik. Nejuniverzálnější antibiotikum je penicilin, který má širokospektrální účinek a není významně toxický. Podle typu buněk se může samozřejmě přistoupit k použití jiného přípravku.

Tabulka 1: Doplňky základních kultivačních médií

Název typu složky	Jednotlivá složka
Proteiny	albumin, alfa ₁ -antitrypsin, alfa ₂ -makroglobulin, beta ₁ -lipoprotein, esenciální aminokyseliny, fibronectin, transferin
Cytokiny a růstové faktory	IL-1, IL-2, inzulínu podobně růstové faktory, růstový faktor destičkový, endoteliální, epidermální, fibroblastický a nervový
Hormony	glukagon, hydrokortizol, inzulín, parathormon, progesteron, růstový hormon, testosteron, trijodthyronin, tyroxin
Mastné kyseliny a lipidy	esenciální mastné kyseliny, fosfolipidy, cholesterol, triacylglyceroly
Sacharidy	fruktóza, galaktóza, glukóza, ribóza
Stopové prvky	kalcium, mangan, měď, selen, zinek, železo
Vitaminy	biotin, folát, kalciferol, kobalamin, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, niacin, pyridoxin, retinol, riboflavin, tokoferol

Data převzata z: Šebek, 2018

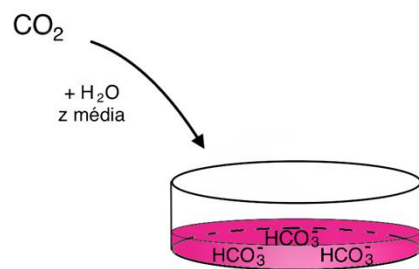
2.3 Udržení pH

Inkubátor zajišťující vyšší koncentraci CO₂ se využívá pro udržení správného pH média. CO₂ se rozpouští ve vodě za vzniku kyseliny uhličitě a dohromady s bikarbonátem sodným (NaHCO₃) přítomným v médiu tvoří účinný pufrovací systém. Ten je schopen do určité míry stabilizovat pH a při jeho vychýlení ho vrátit zpět na požadovanou hodnotu.

Princip účinku je následující. CO₂ se rozpouští v médiu, kde reaguje s vodou a vzniká tak kyselina uhličitá, která disociuje na proton a hydrogenuhličitanový aniont. Rovnice je znázorněna na Obrázku č. 4. (Hatina, J., Kripnerová, M., 2014)

Obrázek 4: Schéma udržení pH

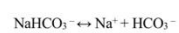
Převzato a upraveno od: Hatina, J., Kripnerová, M., 2014



1. rovnice:



2. rovnice:



3 Fetální bovinní sérum

3.1. Základní informace a složení

Fetální bovinní sérum (FBS) se začalo používat v 50. letech 20. století na tkáňových kulturách, aby stimulovalo buněčný růst. Od té doby se média suplementovaná FBS začala používat jako univerzální média při kultivaci lidských a zvířecích buněk. Samozřejmě jsou dostupné jiné varianty séra, ale právě fetální bovinní sérum má díky nízkému obsahu imunoglobulinů ideální složení.

Sérum slouží jako zdroj růstových faktorů, mastných kyselin, lipidů, aminokyselin, a v neposlední řadě také faktorů, které napomáhají přichycení a proliferaci buněk.

Současné zákony kladou velký důraz na citlivé a etické zacházení se zvířaty. Hlavní rizikový faktor je bez pochyby způsob získávání FBS. (*Gstraunthaler, Gerhard, 2018*)

3.2 Způsob získávání

Fetální bovinní sérum je získáváno z krve nenarozených telat. Stává se poměrně často, že jsou ve stádech krávy a býci pohromadě a nelze tak vždy zaručit, že kráva není březí. Upřednostňujeme ty krávy, kdy je plod alespoň tři měsíce starý, jelikož jinak je srdce příliš malé pro odběr.

Je logické, že množství séra, které tedy získáme, záleží na velikosti plodu. Z plodu, který je starý tři měsíce, získáme přibližně 150 ml surového FBS, z šestiměsíčního plodu pak 350 ml. Roční celosvětová produkce FBS je odhadována na 500 000 litrů. (*Jochems, 2002*)

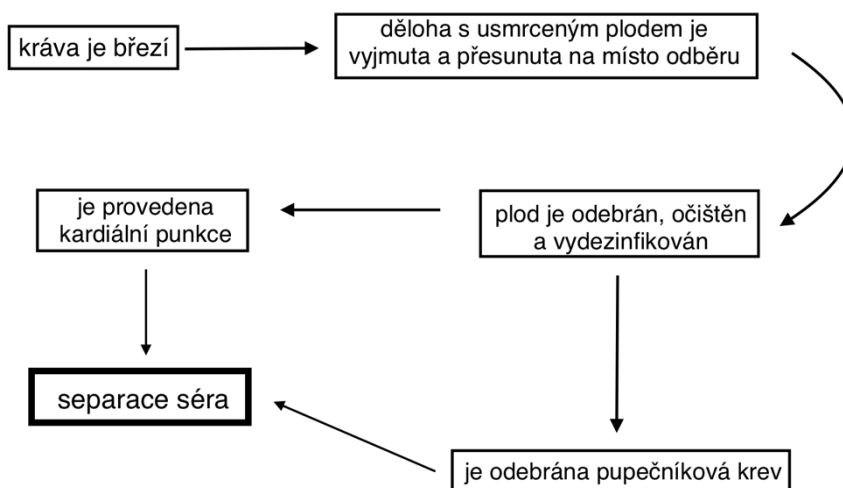
Aby bylo možné odebrat co největší množství krve, odběr se provádí pokud možno z bijícího srdce, což je právě jádro etického problému, jelikož podle principu předběžné opatrnosti předpokládáme, že je plod při odběru vystavován bolesti a stresován. (*Gstraunthaler, Gerhard, 2018*)

Plod trpí nedostatkem kyslíku, jelikož je po vyjmutí z matčina těla odříznut od kyslíku. Nedostatek kyslíku může zasahovat do nervových procesů jako je přenos signálu.

(Jochems,2002) Tento odběr v konečném výsledku vede ke smrti plodu. (Gstraunthaler, Gerhard, 2018)

Kardiální punkce je upřednostňována z důvodu malého rizika kontaminace odebírané krve. (Jochems,2002) Odběr je ale možný i z již usmrčených telat. Schéma odběru jsem pro větší přehlednost překreslila do následujícího obrázku. Uvedla jsem zde jak klasickou cestu odběru, také i méně častý způsob odběru, kterým je odběr pupečnickové krve. (Gstraunthaler, Gerhard, 2018)

Obrázek 5: Průběh získávání fetálního bovinního séra



Převzato a upraveno od: Jochems,2002

Pokud se během vyjímání orgánů zjistí, že kráva byla březí, přemístí se reprodukční trakt do zpracovatelské části, která je určena přímo pro tyto účely a je oddělena od zbývajících částí jatek. Nenarozené tele je urychleně vyndáno z dělohy. Plod je očištěn od plodových obalů a vydesinfikován. Proces odběru je zahájen bez jakékoliv anestézie zasunutím jehly mezi žebra přímo do srdce a odsátím pod tlakem do sběrného vaku. Jednou z dalších možností je odběr masáže srdce. V tomto případě je sběrný vak umístěn pod plodem a krev se nechá srazit při snížené teplotě i s následnou chlazenou centrifugací. Zbytek plodu je zpracován jako krmivo pro zvířata, případně se ještě mohou získat proteiny nebo tuk. (Jochems,2002)

3.3. Problémy užití

V předchozí kapitole jsem podrobně popsala způsob odběru, který je bezpochyby hlavní důvod, proč se snažíme najít jiné alternativy. Další nevýhodou je i určitá variabilita, která je daná hned několika body. Složení FBS je do určité míry ovlivněno složením krmiv, ročním obdobím nebo také geografickou polohou, kde se daný chov nachází. Mezi faktory, které ovlivňují výrobu FBS, patří například aktuální ceny na trhu skotu.

Velkým problémem může být variabilita i mezi jednotlivými šaržemi od stejného výrobce, kdy se takto může ovlivnit reprodukovatelnost jednotlivých experimentů. V případě, kdy je sérum používáno v nějakém důležitém výzkumu, je určitě na místě použít na celý projekt stejnou šarži. (*Jochems, 2002*)

3.4. Regulační podněty

V současné době je i ze strany zákonů snaha a o maximální omezení používání obecně zvířat ve výzkumu a během testování, což se nepřímo týká právě i používání FBS. O tuto problematiku se zajímá také Evropská unie. Její jednotlivé orgány se zasadily o vypracování některých právních předpisů, které se právní cestou snaží eliminovat používání zvířat ve výzkumu.

3.5. Náhrady FBS

Jak je v této bakalářské práci již několikrát zmíněno, snahy o náhradu FBS jsou v současné době velmi usilovné. (*Bieback, 2013; Witzeneder, 2013; Dessel, 2016; Piletz, 2018; Subbiahanadar Chelladurai, 2021*) Požadavky na nové médium jsou následující. Především jednotné a kontrolované chemické složení. To nám zaručí jednotnou kvalitu v celosvětovém měřítku. Dále jsou tu také snahy o snížení možnosti kontaminace. Ale především se klade důraz na etický aspekt.

První chemicky definované médium bylo použito pro primární nervové kultury a tím byl mozkomíšní mok. Na rozdíl od FBS, které obsahuje 8 % proteinů, tak mozkomíšní mok obsahuje pouze 0,001 %. Toto byl první impuls k vytvoření prvního chemicky definovaného média. Postupem času byla tato technologie rozšířena i pro kardiomyocyty, neurony v hipokampu, motoneurony a další buňky.

V současné době neexistuje takové medium, které by se dalo použít pro všechny typy tkáňových kultur. Jedním z důvodů je i vysoká náročnost jednotlivých typů buněk. (Gstraunthaler, 2018).

Inspirací pro experimentální část této bakalářské práce byl článek publikovaný v roce 2020 v časopise *Materials* nazvaný „*3D Cell Culture of Human Salivary Glands Using Nature-Inspired Functional Biomaterials: The Egg Yolk Plasma and Egg White*“, který popisuje kultivaci buněk slinných žláz využívající bezsérové médium založené na plazmě vaječného žloutku. (Charbonneau, 2020)

4 Vývoj, vlastnosti a chemické složení vejce

4.1. Vývoj žloutku

Vejce se dělí na bílek a žloutek. My se budeme podrobněji věnovat žloutku, který je hlavním předmětem mé bakalářské práce. Ten se vyvíjí ve vaječnících. Vlastní vajíčko je klasická buňka s jádrem. Postupně vlivem ukládání rezervních látek se vajíčka zvětšují. V konečné fázi růstu jsou viditelná i pouhým okem. Toto stádium nazýváme jako zárodečný folikul. Zhruba deset až čtrnáct dní před uvolněním z vaječníků, se začne ve folikulu ukládat zásobní žloutek ve formě zrníček, které postupně vytlačí původní jádro na okraj. Jakmile žloutek opouští vaječníky je skoro celý vyplněn žloutkovou hmotou, původní plazma vajíčka je tu pouze ve formě malého ostrůvku okolo zárodečného disku. Jak vajíčko postupuje vejcovodem, je postupně obaleno vazivovou blánou, která je bohatá na krevní cévy. Než žloutek doputuje do dělohy, je obalen ve vejcovodech bílkem.

4.2. Vlastnosti

Žloutek má po snesení tvar koule a na stranách je mírně zploštělý. V průměru má průměrně 3,25 centimetrů. Po snesení je ve středu udržován chalázami (poutky, tj. speciálními provazci připevňujícími žloutek k membráně). Jelikož je po snesení žloutek těžší, klesá mírně do spodní části vajíčka. Postupem času žloutek přijímá vodu z bílku a díky vysychání bílku se opět stahuje více do středu vajíčka. Samotný žloutek se skládá z vrstev světlého a tmavého žloutku. Pokud slepice pravidelně snáší, skládá se žloutková hmota z šesti vrstev světlého a z šesti vrstev tmavého žloutku. Vrstvy tmavého žloutku jsou dvakrát silnější než vrstvy světlejšího. Vrstvy žloutkové hmoty jsou výsledkem denního přírůstku hmoty ve vaječniku. V případě, že má slepice dostatek krmiva, se tvoří tmavý žloutek. V noci se potom tvoří vrstvy se světlým žloutkem. Důležité je také množství pigmentů, které je přijímáno ve stravě. V případě, že má slepice těchto pigmentů nadbytek, barevně odlišené vrstvy se nevytvoří.

Ve středu se nachází malý ostrůvek, tzv. latebra. Její obsah tvoří světlá žloutková hmota, která zůstane vždy tekutá i navzdory vaření. Z latebry vystupuje na jednu stranu i tzv. krček latebry, který se rozlišuje v tzv. Panderovo jádro. Vlastní vaječnou buňku najdeme právě ve hmotě Panderova jádra jako zárodečný terčík.

Mikroskopicky je žloutek emulze s mikroskopickými kapičkami. U světlého žloutku jsou drobnější. Barva žloutku je závislá na množství karotenoidních pigmentů.

4.3. Chemické složení žloutku

Chemické složení vejce musíme specifikovat přímo na konkrétní typ drůbeže. Jiné složení má vejce od vodní drůbeže a jiné od hrabavé drůbeže. Vejce se tedy například liší v obsahu lipidů a sušiny. Co je naopak víceméně stejné, je obsah bílkovin. Pro náš výzkum je ale hlavní vajíčko slepičí. V následující tabulce přehledně shrnuji chemické složení slepičího vejce. Hodnoty jsou uváděny v procentech.

Tabulka 2: Chemické složení slepičího vejce

	voda	sušina	bílkoviny	lipidy	sacharidy	minerální látka
celé vejce	65,6	34,4	12,1	10,5	0,9	10,9
skořápka a blány	1,6	98,4	3,3	stopy	stopy	95,1
bílek	87,9	12,1	10,6	stopy	0,9	0,6
žloutek	48,7	51,3	16,6	32,6	1	1,1

Data převzata z: *Saláková, 2014*

Žloutek tvoří především lipidy a to až 75 % sušiny, zbytek tvoří bílkoviny (livetiny). Livetiny jsou bílkoviny plazmy. Nachází se zde i fosfovitin. Ten řadíme mezi bílkoviny granulí. Je velmi teplotně stabilní. Denaturuje až při teplotě 100 °C. Lipoproteiny tvoří 63,5 % bílkovin žloutku. Mezi ně řadíme viteliny a viteleniny, to jsou glykoproteiny obsahující fosfor vázané na lipidy. Lipidy tvoří asi 33 % sušiny žloutku. Přibližně dvě třetiny z tuků tvoří acylglyceroly a zbývající jednu třetinu tvoří fosfolipidy, steroly a cerebrosidy.

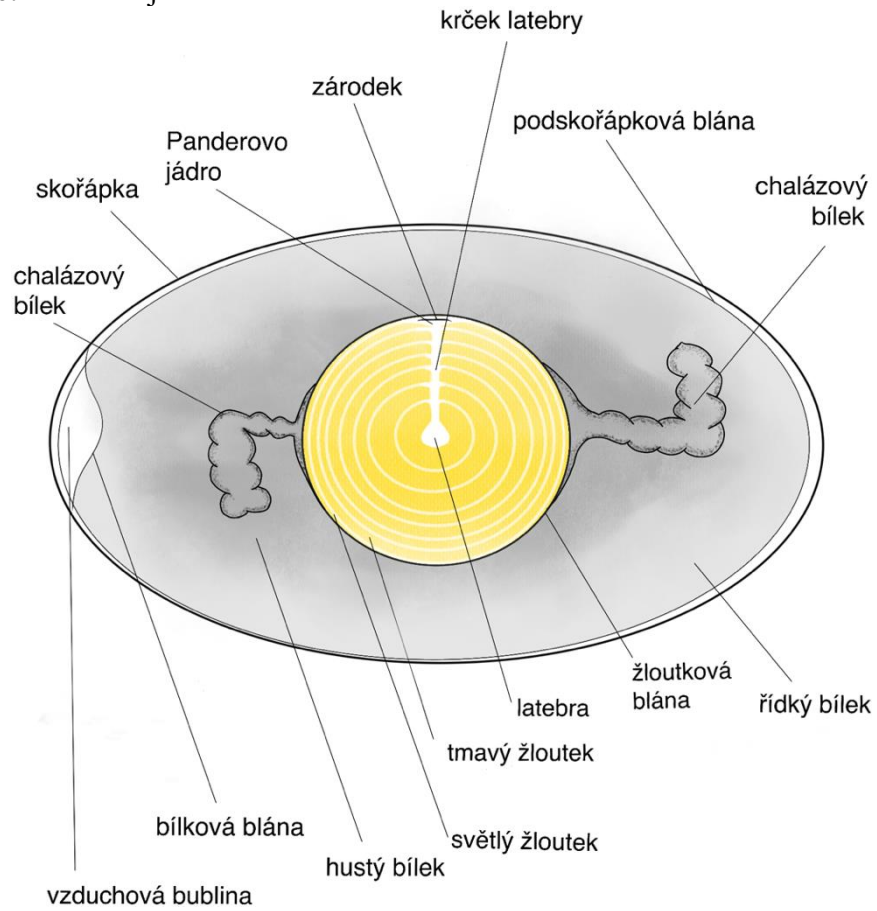
Kromě lipidů obsahuje žloutek i nenasycené mastné kyseliny. Ve žloutku jich najdeme přibližně 70 %. Nejvíce zastoupená je zde kyselina olejová, následně po ní kyselina linolová. Přibližně 8-20 % z nenasycených mastných kyselin zaujímají polynenasycené mastné kyseliny. Nasycené mastné kyseliny tvoří asi 30 % žloutku. Z nasycených mastných kyselin je nejvíce zastoupena kyselina palmitová a o něco méně kyselina stearová.

Ze sterolů je nejvýznamnější cholesterol, znát jeho množství je důležité. Jak jsem již naznačila v úvodu, tak zastoupení některých látek se mezi druhy nepatrně liší,

cholesterol k těmto látkám také patří. Více cholesterolu nalezneme ve vejcích vodní drůbeže a v krůtích vejcích. Hladina cholesterolu také klesá v průběhu života nosnice, tudíž nejvíce ho najdeme u mladých slepic. Bylo potvrzeno, že u vajec s hnědou skořápkou je obsah cholesterolu vyšší než u vajec s bílou skořápkou. Také vejce z velkochovu se vyznačují nižším množstvím cholesterolu. V současné době uvádíme 840–1310 mg cholesterolu na 100 g vaječného žloutku. Pro jeden žloutek to pak tedy vychází 150–340 mg cholesterolu v jednom vejci. Ve výsledku z hlediska poměru nasycených a nenasycených kyselin má žloutek velmi dobré výživové hodnoty.

Ve žloutku najdeme velice nízké množství sacharidů (cca 1 %). Z toho nejvíce sacharidů je vázaných na bílkoviny. Volných sacharidů je asi 0,13–0,20 %. Žloutek obsahuje i vitamíny, a to jak vitamíny rozpustné v tucích tak i vitamíny rozpustné ve vodě. Hydrofilní vitamíny různě prostupují mezi žloutkem a bílkem. Řadíme sem nikotinamid, kyselinu pantotenovou a kyselinu listovou. Lipofilní vitamíny (především A a K) jsou nerovnoměrně rozloženy ve žloutku. Obsah minerálních látek je u vejce také velmi pestrý. Ve žloutku najdeme fosfor, železo, mangan, selen, kobalt nebo také nikl, chrom, měď, baryum, jod a sodík. Ve světlém žloutku jsou tyto minerální látky zastoupeny osmkrát častěji než v tmavém žloutku. Naopak v tmavém žloutku najdeme většinu barevných pigmentů. *(Saláková, 2014)*

Obrázek 6: Složení vejce



Překresleno z: (Saláková, 2014)

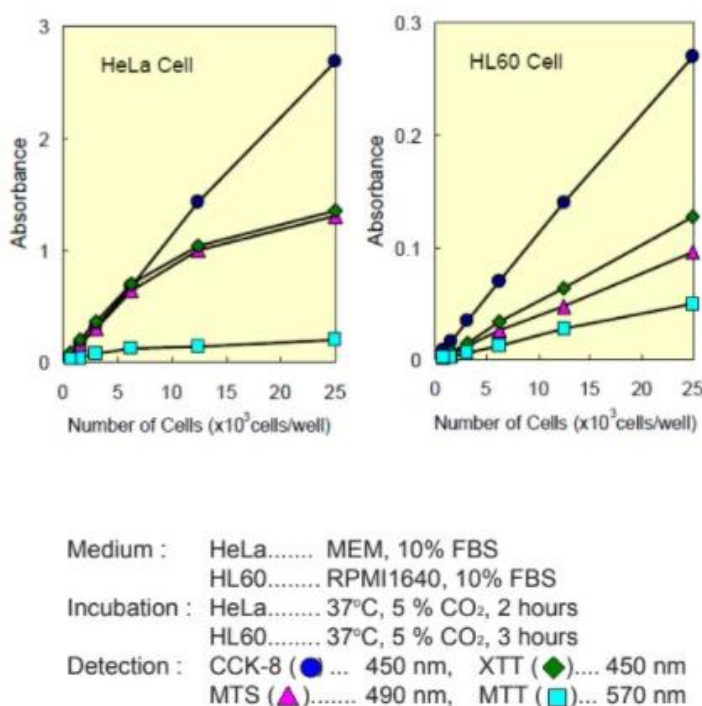
5 Buňky MG 63

Buňky, které jsme použili pro experimentální část, jsou tzv. MG-63. Byly získané z kosti čtrnáctiletého chlapce, který trpěl osteosarkomem. Další doplňující informace, jako například technické informace, jsou dostupné v příloze A.

6 Metoda CCK-8

Tato metoda se používá ke zjištění živých buněk v tkáňové kultuře. Principem je využití přeměny substrátu v barevný produkt, díky fyziologickým pochodům v buňkách. Tuto metodu používáme, jelikož je více senzitivní než ostatní metody měření viability. Metoda má velmi jednoduché použití. Set je od výrobce již připraven k použití, nemusíme ho tudíž ředit ani rozpouštět. Výhodou je i poměrně dlouhá doba expirace a to až jeden rok. Hlavní výhodou je velmi nízká toxicita v porovnání s ostatními metodami. Následující srovnání nám ukazuje, že použití CCK-8 má nižší cytotoxické účinky než ostatní metody. Buňky lze v médiu po použití CCK-8 uchovat až 48 hodin.

Obrázek 7: Srovnání CCK-8 s jinými metodami



Zdroj: <https://dojindo.com/product/cell-counting-kit-8/>

Samotný princip je velmi jednoduchý. Ke stanovení se využívá vysoce rozpustná tetrazoliová sůl WST-8 [2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2H-tetrazolium, monosodná sůl]. Ke změně v barevný produkt dochází díky redukcí dehydrogenázou v buňkách, která uvolní vodík z NADH a ten spolu s elektronem změni původní substrát v formazan. Ten je žlutý a můžeme ho detekovat spektrofotometricky. Množství vytvořeného produktu je přímo úměrné počtu živých buněk. Výsledky získáme měřením absorbance v mikrotitrační destičce. (Yang, 2021)

Postup je následující. Buňky je výhodné kultivovat v destičkách s 96 jamkami, protože je pak menší spotřeba činidla. Ke 100 μ l kultivačního média v jamce přidáváme 10 μ l CCK-8 roztoku. Inkubujeme 1 až 4 hodiny standardně v inkubátoru. Po skončení inkubace odebereme část média do nové mikrotitrační destičky, ve které měříme absorbanci při 450 nm pomocí readeru, který je na Obrázku č. 8.

Obrázek 8: Čtečka destiček



Zdroj: vlastní

PRAKTICKÁ ČÁST

7 CÍL A ÚKOLY PRÁCE

7.1 Hlavní cíl

Cílem naší práce bylo zjistit, zda je možné buňky tkáňových kultur kultivovat v médiu s plazmou vaječného žloutku (EYP) namísto fetálního bovinního séra (FBS).

7.2 Dílčí cíle

1. Optimalizovat v literatuře popsanou přípravu plazmy vaječného žloutku.
2. Najít optimální poměr DMEM a EYP pro dlouhodobou kultivaci.
3. Posoudit vliv množství a formy (nativní nebo s adjustací pH) plazmy vaječného žloutku na chování buněk.

8 Hledání optimální koncentrace

Sérií kultur jsme se pokoušeli najít optimální koncentraci, při které buňky MG-63 budou proliferovat co nejlépe. Jako negativní kontrola nám sloužilo DMEM médium bez jakékoli suplementace FBS. Jako pozitivní kontrolu jsme použili standardní kombinaci média DMEM a FBS v koncentraci 10 %.

8.1. Zahájení práce s buňkami MG-63

První den kultivace jsme začali tím, že jsme si připravili kompletní DMEM + FBS médium pro optimální kultivaci buněk. Postup pro přípravu média je v minulé kapitole. Připravené médium jsme vložili temperovat v Petriho misce do inkubátoru. Docílíme tím toho, že médium nebude příliš alkalické.

Dalším krokem bylo rozmrazení buněk MG-63. Nejlepším postupem je buňky šokově rozmrazit. Bylo nutné pracovat ve velmi sterilních podmínkách z důvodu zamezení nežádoucí kontaminace. Odpipetovali jsme si 1 ml buněčné suspenze z kryozkumavky a přenesli ho do 15 ml falkonky, k tomu bylo přidáno 9 ml vytemperovaného DMEM média bez FBS. Toto nekompletní médium nám sloužilo pouze k centrifugaci, proto nebylo nutné připravovat kompletní médium obohacené o FBS a další složky. Vzorek jsme centrifugovali na 700 otáček/min celkově 5 minut. Odsáli jsme supernatant a přidali 1 ml kompletního DMEM média s FBS, pečlivě propipetovali a vysadili na misku. Tu jsme umístili do inkubátoru s 5 % CO₂.

Druhý den byla provedena kontrola růstu a kontaminace. Buňky by neměly plavat a ani mít tečkování. To, jak jsou narostlé, hodnotíme podle míry konfluence. Udáváme ji v procentech. Jakmile je míra konfluence vysoká, je nutné provést pasážování buněk. V případě potřeby vyměníme médium.

Třetí den kultivace bylo u buněk MG-63 nutné provést pasážování se současnou výměnou média. Přesný postup najdeme v kapitole 1.3.1. Pasážování. Nakonec jsme potřebnou část buněk nasadili do nových misek a opět jsme je přesunuli do inkubátoru, abychom získali dostatečné množství buněk na následující experimenty.

Závěr první části práce byl takový, že jsme si vykultivovali potřebné množství buněk k dalšímu pokusu a zhodnotili jsme buněčnou linii, zda je připravená a schopná další kultivace.

8.2. Příprava 3 druhů médií

Pro pilotní pokus si bylo nutné připravit tři různé modifikace základního DMEM média. První z nich nám sloužila jako pozitivní kontrola (DMEM médium s FBS a dalšími složkami jako jsou antibiotika a glutamin). Jako negativní kontrolu jsme použili stejné medium jako u pozitivní kontroly, ale bez přídavku FBS. U třetího media jsme přidali místo FBS plazmu vaječného žloutku. Přesné složení je pro lepší orientaci a větší názornost rozepsáno v tabulkách.

Tabulka 4: Pozitivní kontrola: DMEM + FBS

DMEM + 4,5 g/l glukosy	50 ml
Fetal Bovine Serum	6 ml (\Rightarrow finální koncentrace \approx 10%)
Penicilin/streptomycin	0,55 ml
Stabilní glutamin 100\times	0,5 ml (\Rightarrow finální koncentrace \approx 2 mM)

Zdroj dat: vlastní

Tabulka 5: Negativní kontrola: DMEM

DMEM + 4,5 g/l glukosy	50 ml
Penicilin/streptomycin	0,55 ml
Stabilní glutamin 100\times	0,5 ml (\Rightarrow finální koncentrace \approx 2 mM)

Zdroj dat: vlastní

Tabulka 6: Médium s plazmou vaječného žloutku: DMEM + EYP

DMEM + 4,5 g/l glukosy	50 ml
Vaječná plazma ve fyziologickém roztoku	6 ml
Penicilin/streptomycin	0,55 ml
Stabilní glutamin 100\times	0,5 ml (\Rightarrow finální koncentrace \approx 2 mM)

Zdroj dat: vlastní

8.3. Pilotní pokus - kultivace v médiu s plazmou vaječného žloutku bez úpravy pH

Jakmile jsme měli připraveno dostatečné množství buněk, přistoupili jsme k dalšímu kroku, kterým již byl pilotní pokus kultivace buněk v médiu s plazmou vaječného žloutku namísto FBS.

Důležitým krokem byla příprava plazmy vaječného žloutku (EYP). Pro úvodní experimenty jsme převzali v literatuře popsany postup. (*Charbonneau, 2020*)

Předpokladem samozřejmě bylo pracovat v laminárním boxu a se sterilními nástroji z důvodu zachování sterility. Připravili jsme si dvě kádinky, abychom rozdělili bílek a žloutek. Úplným základem bylo skořápku vejce řádně vydesinfikovat a připravit si filtrační papír, na který nastříkáme 70% ethanol a necháme zaschnout. Očištěnou skořápku jsme opatrně rozřízli skalpelem a bílek jsme nechali vytéct do připravené kádinky.

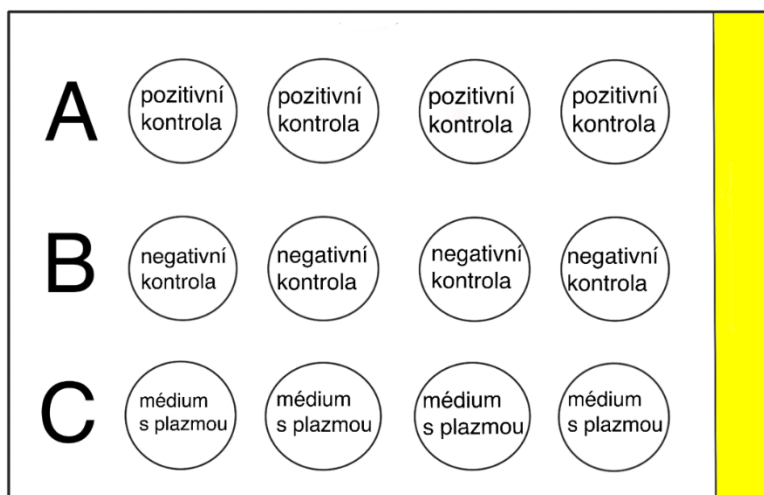
Žloutek jsme následně vylili na připravenou utěrku. Velmi opatrně jsme žloutek pováleli po filtračním papíře a zbavili ho zbytku bílku. Řádně jsme osušili žloutek v horní části, kde byla blána jehlou propíchnuta, a pipetou jsme odpipetovali vnitřek bez blány do odměrného válce. Ke žloutku jsme přidali v poměru 1:1 0,17 M roztok NaCl a rozmíchali. Jeden žloutek má objem průměrně 14 ml. Vzniklou směs jsme rozpipetovali do eppendorfek a centrifugovali 25 minut/8 500 otáček. Sediment nedržel pevně na dně, proto byla potřeba velmi opatrně odpipetovat supernatant do nové zkumavky. Plazma vaječného žloutku byla takto připravena k použití.

Na kultivaci v jednotlivých médiích použijeme narostlé buňky z předchozí kultivace (kapitola 8.2. Zahájení práce s buňkami MG-63).

Museli jsme také zvolit vhodný počet buněk, aby bylo možné brát výsledky jako validní. Pro náš výzkum jsme zvolili množství 5000 buněk na jednu jamku. Z Bürkerovy komůrky jsme si spočítali, že naše suspenze obsahuje 437 500 buněk v 1 ml. Suspenzi jsme si nejdříve naředili na 50 000 buněk/ml. Na naředění jsme použili DMEM médium bez séra. Jelikož jsme potřebovali 5000 buněk na jamku. Dopoteme si požadovaném množství buněk. V případě, že máme v 1 ml (1000 μ l) 50 000 buněk, vychází nám, že musíme přidat 100 μ l, abychom měli požadovanou hustotu 5 000 buněk na jamku.

Připravíme si 12 jamkovou destičku, média byla napipetována podle následujícího schématu. Nasadili jsme do každé jamky 2 ml příslušného média a 100 µl buněčné suspenze.

Obrázek 9: Pilotní pokus – obsah jamek na destičce



Zdroj: vlastní

Provedeme ještě kontrolu pod mikroskopem, zda jsou jamky osazeny stejnoměrně. Buňky jsme přesunuli do inkubátoru a nechali růst do druhého dne. Pro provedení kontroly byly zjištěny následující výsledky

Tabulka 7: Výsledky po 24 hodinách kultivace

řádek A	DMEM + FBS (buňky živé, 10% konfluence)
řádek B	DMEM (buňky živořící)
řádek C	DMEM + EYP (buňky mrtvé)

Zdroj dat: vlastní

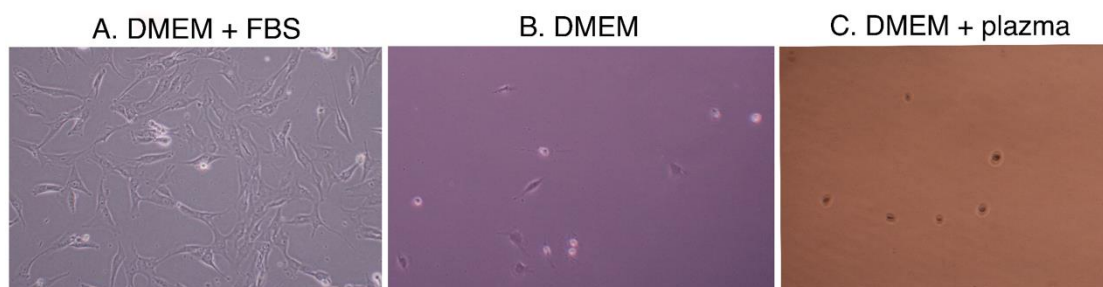
Rozhodli jsme se ponechat buňky ještě 36 hodin kultivovat.

Tabulka 8: Výsledky po 60 hodinách kultivace

řádek A	DMEM + FBS (buňky živé, 40% konfluence)
řádek B	DMEM (buňky živořící, neproliferují)
řádek C	DMEM + EYP (buňky mrtvé)

Zdroj dat: vlastní

Obrázek 10: Výsledky po první kultivaci



Zdroj dat: vlastní

Závěrem tohoto pilotního pokusu bylo, že buňky MG-63 v samotném DMEM médiu bez jakéhokoliv suplementu (negativní kontrola) sice přeživaly, ale neproliferovaly. Tím jsme potvrdili, že další suplementy jsou pro viabilitu a proliferaci buněk nutné. V médiu s plazmou vaječného žloutku (EYP) buňky nebyly vůbec životaschopné. Přídavek EYP se zdál být pro buňky dokonce toxický. Možným problémem podle našich závěrů bylo pH vaječné plazmy. Proto jsme se v další práci soustředili na úpravu pH vaječné plazmy. Také jsme se rozhodli poupravit krok centrifugace během přípravy EYP.

8.4 Kultivace v médiu s plazmou vaječného žloutku s úpravou pH

Jelikož byla předchozí kultivace neúspěšná, provedly jsme úpravu pH plazmy vaječného žloutku. Postup byl následující:

8.4.1 Příprava EYP

Připravili jsme si jednu kádinku na bílek a jednu kádinku na žloutek. Dále jsme si připravili papírový ručník nastříkaný 70% ethanolem a nechali ho uschnout. Před separací vnitřního obsahu vajec jsme očistili vnější povrch skořápek 70% ethanolem. Na okraji sterilní kádinky o objemu 250 ml jsme vejce rozlomili (skalpelem), bílek vypustili a žloutek udržovali ve skořápce.

V dalším kroku jsme žloutek vylili na papírový ručník a osušili na papírovém ručníku válením, abychom odstranili zbytky bílku. Pipetou jsme odsáli krouživým pohybem tekutý žloutek bez blány a případného zbytku bílku do 1,5 ml eppendorfky (objem žloutku cca. 10 ml).

Následovala centrifugace při 14 500 g, 30 minut, 20-25 °C. Výsledek ale nebyl dobrý. Pokračovali jsme v centrifugaci při 14 500 g, 30 minut, 20-25 °C. Výsledek se zlepšil. Přistoupili jsme ale ještě k jednomu cyklu centrifugace, a to při 16 500 g, 120 minut, 20-25 °C. To už byla vyččena zhruba polovina objemu.

Supernatant jsme opatrně odpipetovali do sterilní 15 ml zkumavky. Přidali jsme 0,17 M roztok NaCl v poměru 1 : 1 a rozmíchali. Naplnili jsme do 1,5ml eppendorfek a ještě jednou centrifugovali 45 minut při 10 000 g při 10 °C.

Následovala úprava pH. Pracovali jsme v laminárním boxu. Nejdříve jsme si 5 ml vaječné plazmy v 50 ml falkonce umístili do kádinky spolu s vodou o teplotě 37 °C. Potom jsme postupně přidávali 0,375 M NaOH, dokud hodnota pH nedosáhla 7,52. S takto připravenou EYP s upraveným pH jsme mohli přejít k dalším experimentům s kultivací buněk.

8.4.2 Testování cytotoxicity EYP

V pilotním pokusu jsme nabyly podezření na cytotoxicitu námi připravené plazmy vaječného žloutku. Rozhodli jsme se proto otestovat, jaký má přídavek EYP vliv na buňky pěstované ve standardním médiu s FBS. Zajímá nás i efekt dávky EYP, proto jsme zkoušeli čtyři různé koncentrace EYP v jednotlivých jamkách. Tj. do jamek jsme přidávali EYP dle schématu:

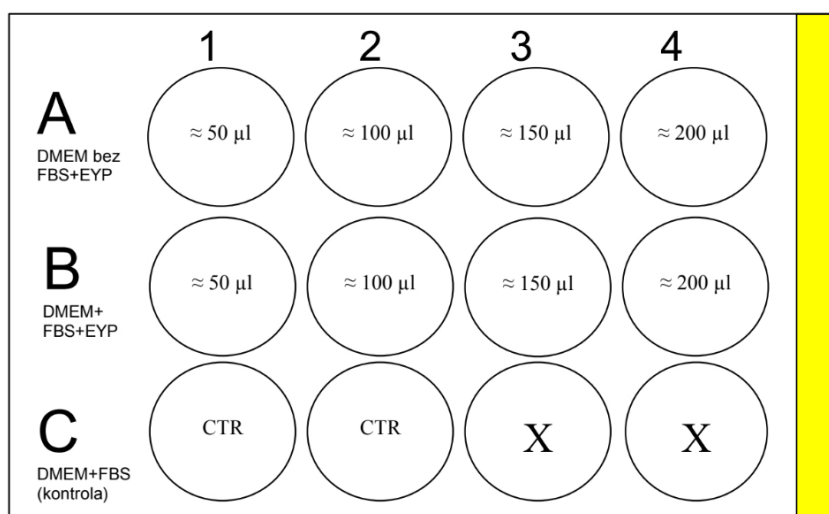
2 ml média + 50 µl EYP (2,5%)

2 ml média + 100 µl EYP (5 %)

2 ml média + 150 µl EYP (7,5 %)

2 ml média + 200 µl EYP (10 %)

Obrázek 11: Testování cytotoxicity EYP – obsah jamek na destičce



Zdroj: vlastní

Byla provedena kontrola pod mikroskopem, zda jsou buňky opět nasazeny stejnoměrně. První kontrolu vlivu EYP na buňky jsme dělali po 24 hodinách, druhá pak následovala po dalších 24 hodinách.

Tabulka 9: Mikroskopická kontrola po 24 hodinách kultivace

řádek A	DMEM bez FBS + EYP (buňky mrtvé)
řádek B	DMEM + FBS + EYP (buňky živořící)
řádek C	DMEM + FBS (buňky živé, 40% konfluence)

Zdroj: vlastní

Tabulka 10: Mikroskopická kontrola po 48 hodinách kultivace

řádek A	DMEM bez FBS + EYP (buňky mrtvé)
řádek B	DMEM + FBS + EYP (buňky živořící, ale proliferují, cca 40% konfluence)
řádek C	DMEM + FBS (buňky živé, 100% konfluence)

Zdroj: vlastní

Z výsledků tohoto pokusu vyplynulo, že námi připravená plazma vaječného žloutku působí na buňky nepříznivě. Její přídavek ke kompletnímu médiu s FBS zhoršuje viabilitu buněk, v médiu bez FBS pouze s EYP nejsou buňky vůbec životaschopné.

Bylo tedy nutné pokračovat v optimalizaci přípravy plazmy vaječného žloutku a ladění její koncentrace v kultivačním médiu. Snažili jsme se optimalizovat přípravu plazmy vaječného žloutku v následujících bodech:

- způsob centrifugace
- úprava pH
- přidání antibiotik

Jako nejvhodnější postup přípravy EYP se ukázalo následující:

- centrifugace 60 minut na 18 000 otáček při 20 °C
- odebrání supernatantu a úprava pH na 7,30
- ošetření takto získané EYP penicilinem

8.5. Testování nejvhodnější koncentrace plazmy vaječného žloutku v médiu

Po přípravě EYP podle postupu výše a otestování, že už nepůsobí toxicky na buňky, jsme přešli k hledání optimální koncentrace EYP v kultivačním médiu. Destičku s experimentem jsme napipetovali podle následujícího schématu:

Tabulka 11: Schéma pokusu – hledání optimální koncentrace EYP

	1	2	3	4
A	pozitivní kontrola 2 ml DMEM+FBS	volné místo pro blank CCK-8	1,8 ml DMEM 0,2 ml EYP (10 %)	1,6 ml DMEM 0,4 ml EYP (20 %)
B	1,4 ml DMEM 0,6 ml EYP (30 %)	1,2 ml DMEM 0,8 ml EYP (40 %)	1 ml DMEM 1 ml EYP (50 %)	0,8 ml DMEM 1,2 ml EYP (60 %)
C	0,6 ml DMEM 1,4 ml EYP (70 %)	0,4 ml DMEM 1,6 ml EYP (80 %)	0,2 ml DMEM 1,8 ml EYP (90 %)	0 ml DMEM 2 ml EYP (100 %)

Zdroj: vlastní

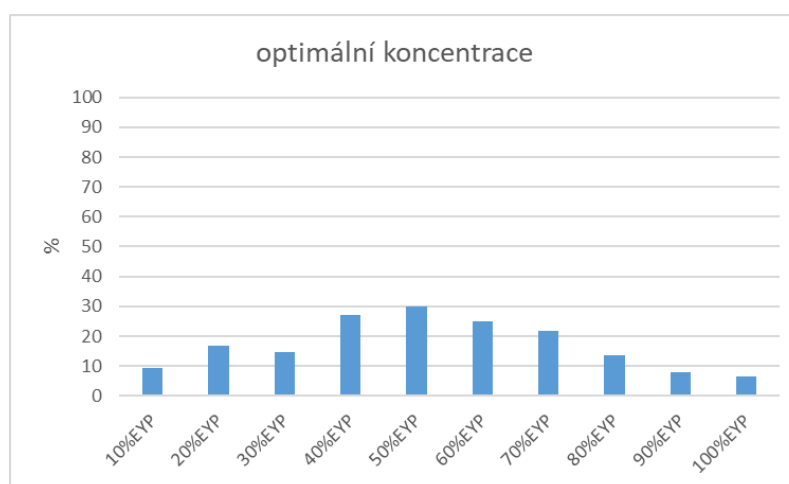
Vlastní experiment zahrnoval kultivační média se vzrůstajícím obsahem EYP, od 10 % až po 100 %. Do jedné jamky jsme tentokrát přidávali 10 000 buněk. Po 48 hodinách jsme provedli kontrolu pod mikroskopem a vyměnili médium. Další kontrolu jsme provedli po 96 hodinách, kdy jsme zároveň otestovali viabilitu buněk pomocí metody CCK-8, ta je podrobně popisována v teoretické části. Získali jsme následující výsledky (Tabulka 11, Graf 2). K dispozici máme i snímky pořízené mikroskopem, udělali jsme jak souhrnný obrázek (Obrázek 12), tak jsme pro větší názornost přidali i jednotlivé fotky ve zvětšeném formátu. (Obrázek 13 – Obrázek 24).

Tabulka 11: Naměřené hodnoty metodou CCK-8

typ měřeného materiálu	výsledná hodnota	typ měřeného materiálu	výsledná hodnota
pozitivní kontrola	0,753	50 % koncentrace EYP	0,225
negativní kontrola	0,000	60 % koncentrace EYP	0,187
10 % koncentrace EYP	0,070	70 % koncentrace EYP	0,163
20 % koncentrace EYP	0,126	80 % koncentrace EYP	0,103
30 % koncentrace EYP	0,110	90 % koncentrace EYP	0,060
40 % koncentrace EYP	0,204	100 % koncentrace EYP	0,050

Zdroj: vlastní

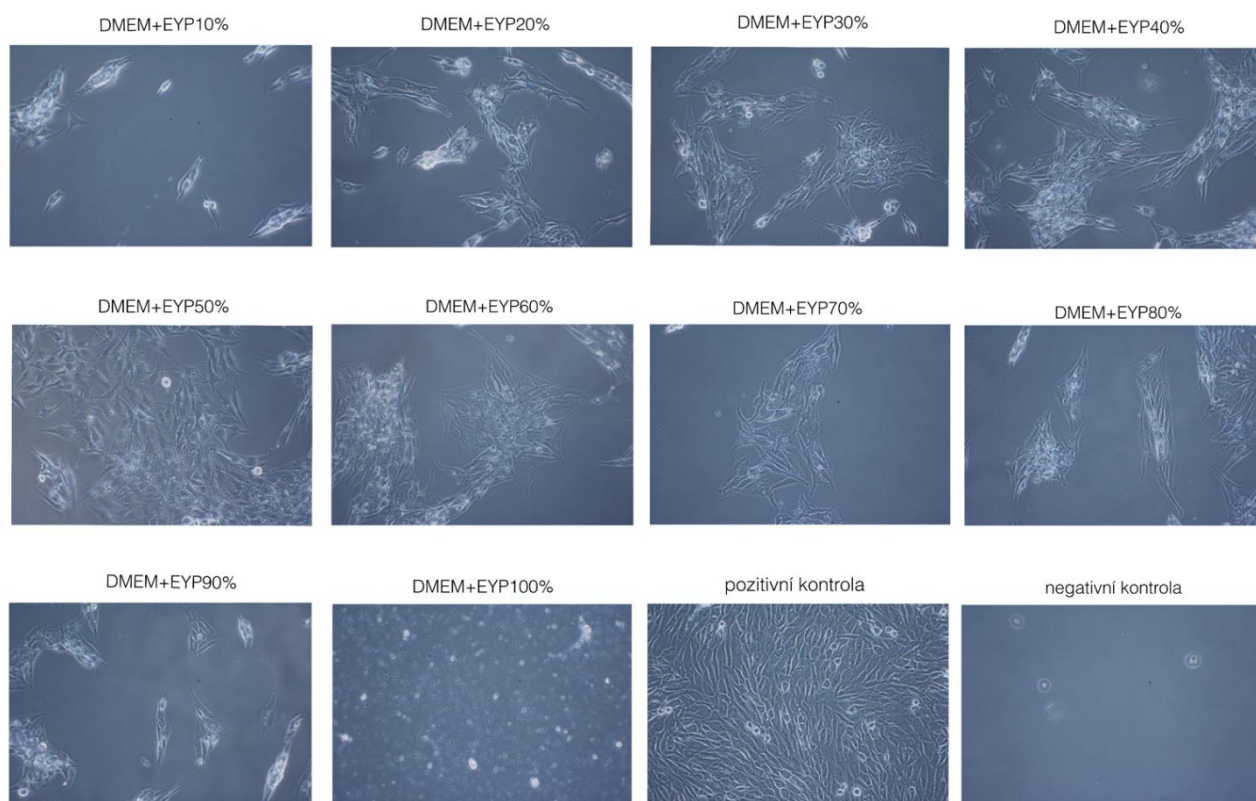
Graf 2: Hledání optimální koncentrace EYP v médiu



Zdroj: vlastní

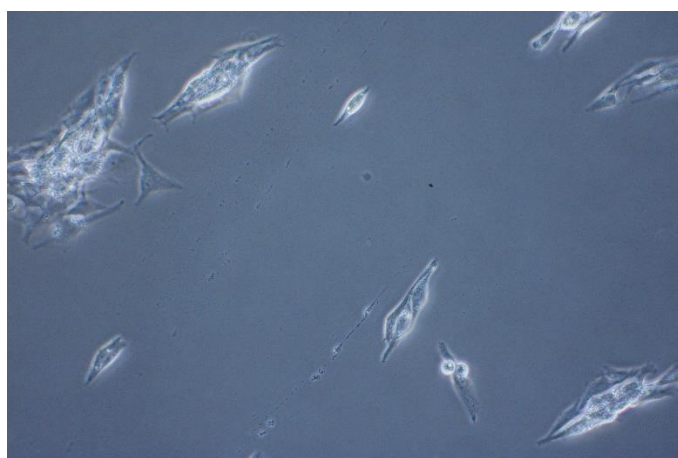
Z výsledků je patrné, že optimální koncentrace plazmy vaječného žloutku v kultivačním médiu je 50 % (tj. poměr DMEM : EYP = 1 : 1), kdy je dosaženo nejlepší viability a proliferace buněk.

Obrázek 12: Snímky MG-63 buněk kultivovaných v médiu s různým obsahem EYP



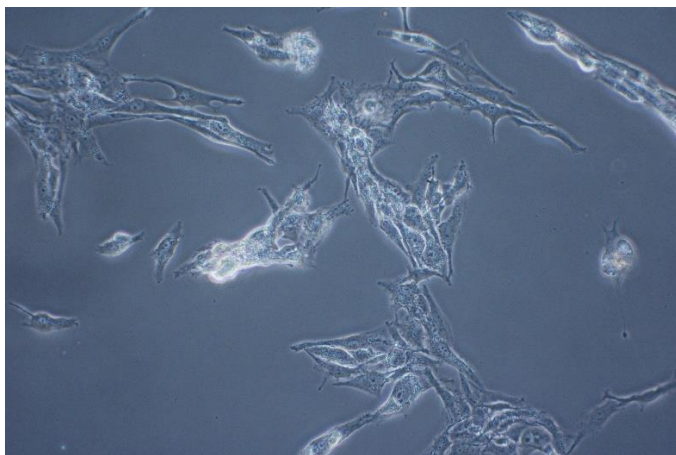
Zdroj: vlastní

Obrázek 13: DMEM + 10 % EYP



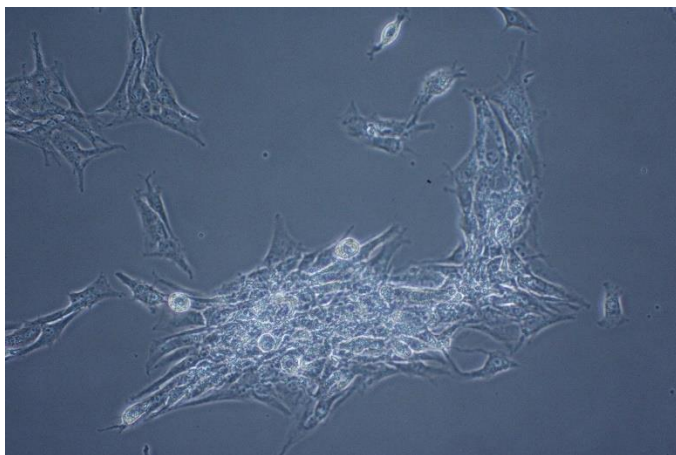
Zdroj: vlastní

Obrázek 14: DMEM + 20 % EYP



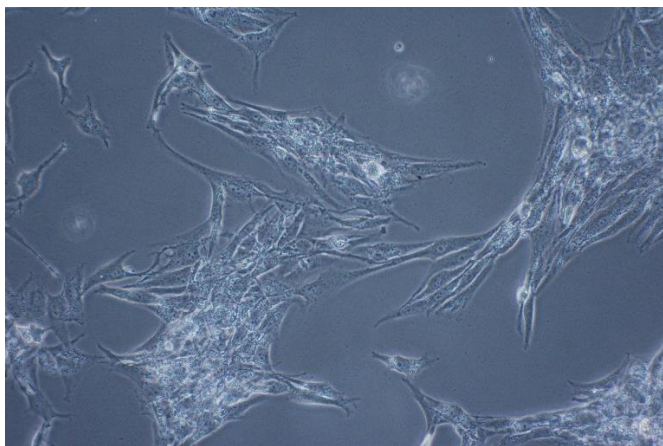
Zdroj: vlastní

Obrázek 15: DMEM + 30 % EYP



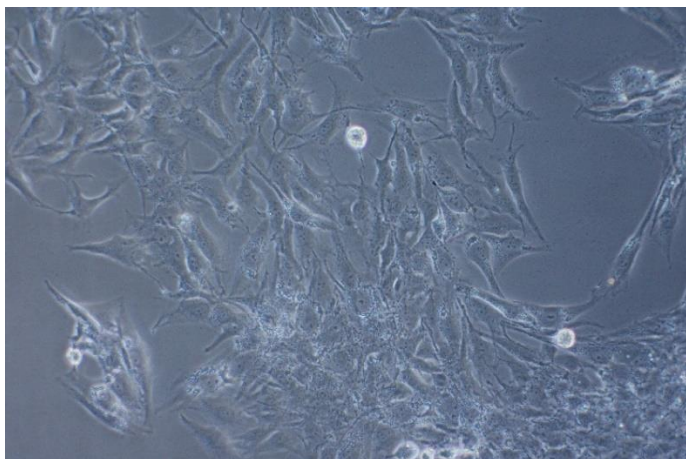
Zdroj: vlastní

Obrázek 16: DMEM + 40 % EYP



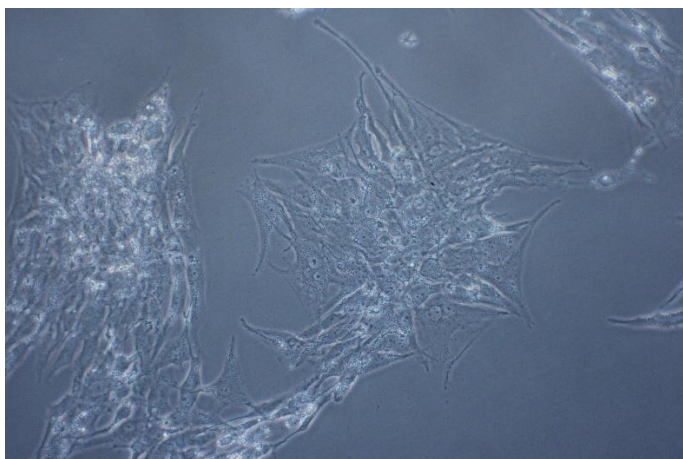
Zdroj: vlastní

Obrázek 17: DMEM + 50 % EYP



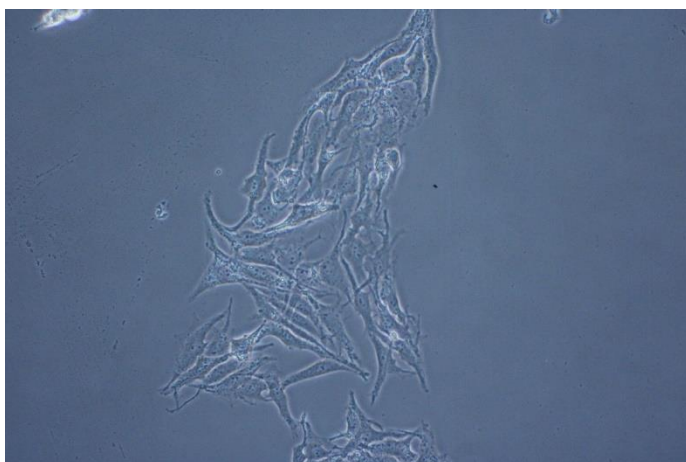
Zdroj: vlastní

Obrázek 18: DMEM + 60 % EYP



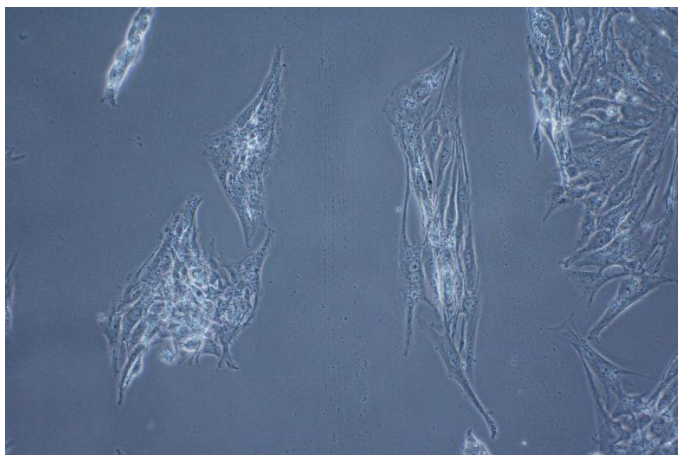
Zdroj: vlastní

Obrázek 19: DMEM + 70 % EYP



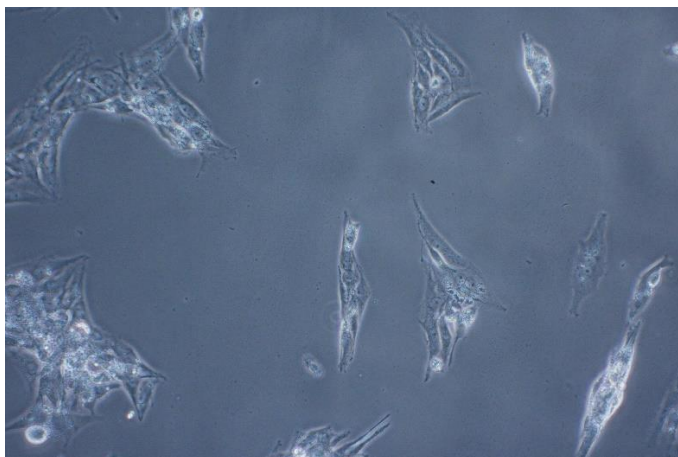
Zdroj: vlastní

Obrázek 20: DMEM + 80 % EYP



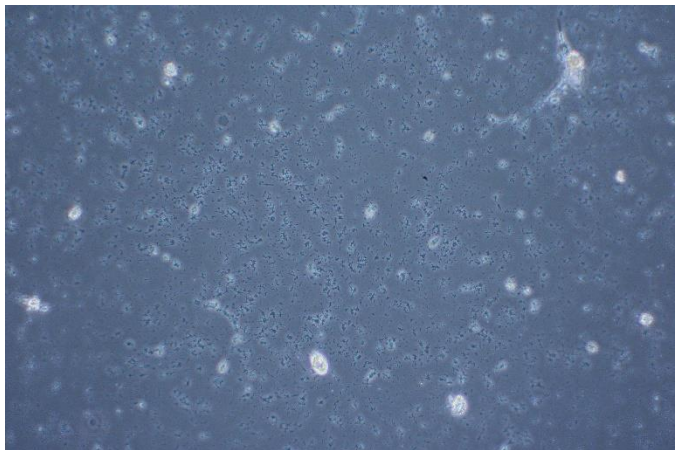
Zdroj: vlastní

Obrázek 21: DMEM + 90 % EYP



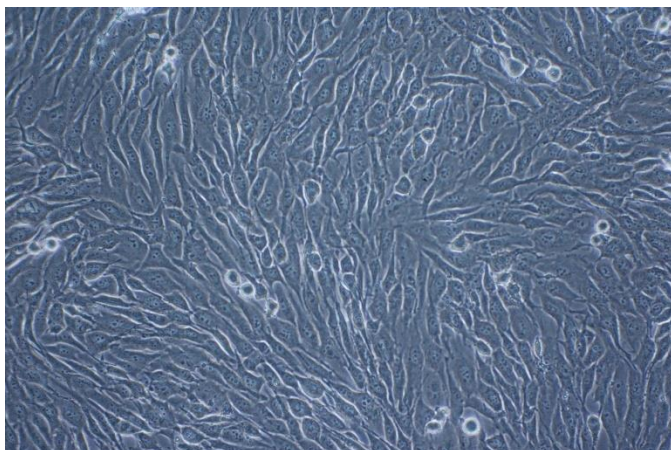
Zdroj: vlastní

Obrázek 22: DMEM + 100 % EYP



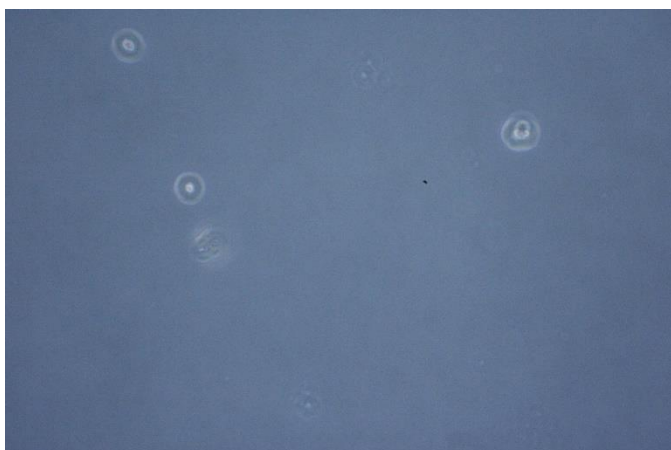
Zdroj: vlastní

Obrázek 23: pozitivní kontrola



Zdroj: vlastní

Obrázek 24: negativní kontrola



Zdroj: vlastní

8.6. Dlouhodobá kultivace v DMEM médiu s 50 % EYP

Po optimalizaci způsobu přípravy EYP tak, aby nepůsobila na buňky toxicky a nalezení nejvhodnější koncentrace EYP v médiu, jsme uskutečnili experiment s dlouhodobou kultivací (opakovaným pasážováním) MG-63 buněk. Buňky byly kultivovány po dobu 3 týdnů, pasážovány byly každé 4 dny (celkem 5 pasáží). Buňky si po celou dobu pokusu udržely viabilitu a proliferovaly, což ukazuje, že náhrada FBS pomocí EYP je možná.

DISKUZE

Naším cílem bylo zjistit, zda je možné pěstovat vybrané buněčné linie v médiu obsahujícím plazmu vaječného žloutku (EYP) namísto fetálního bovinního séra (FBS). Ze série našich experimentů s lidskou buněčnou linií MG-63 (model osteoblastů) nám vyšlo, že to opravdu lze.

Prvním naším úkolem bylo optimalizovat přípravu plazmy vaječného žloutku. Je to příprava, ke které nejsou rozšířené a hlavně rutinně používané postupy přípravy. My jsme sérií kultivací našli pro nás nejlepší způsob přípravy. Velmi důležitým bodem byla centrifugace. Bylo nutné tento proces co nejvíce optimalizovat, aby bylo možné získat, co možná největší množství a co možná nejkvalitnější vzorek zcentrifugované vaječné plazmy. Preventivní ošetření plazmy antibiotiky byl také jeden z klíčových kroků. Jelikož u prvních pokusů buňky v médiu s EYP vůbec neproliferovaly a byly zde známky infekce. Z tohoto důvodu jsme museli přijít k ošetření antibiotiky. Použili jsme penicilin, který jsme dávkovali na přesné množství EYP.

Po optimalizaci přípravy EYP bylo jedním z našich největších cílů nalezení optimální koncentrace EYP v kultivačním médiu. Mohu potvrdit, že toto se nám povedlo. Z výsledků, které jsme získali, je patrné, že nejlepší je poměr 50 % DMEM a 50 % EYP, při kterém proliferace MG-63 buněk dosáhla 30 % hodnoty pozitivní kontroly, tj. standardního DMEM média s přídatkem FBS.

Naše práce ukázala, že i dlouhodobější kultivace buněk je v bezsérovém médiu s EYP možná. Myslím si, že naše výsledky mohou přispět dalšímu vývoji bezsérových médií. V dalším výzkumu navrhujeme vyzkoušet bezsérové médium s EYP i na jiných buněčných liniích.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce s názvem „Plazma vaječného žloutku jako alternativa k séru v kultivačních médiích“ je rozdělena na teoretickou a praktickou část.

V teoretické části je kladen velký důraz na problematiku kultivace buněk obecně. Také jsou zde kapitoly popisující vejce, konkrétněji žloutek a v neposlední řadě buněčnou linii MG-63, se kterou jsme celou dobu pracovali.

V praktické části pak přenášíme naše teoretické úvahy o možnosti náhrady fetálního bovinního séra (FBS) v kultivačních médiích plazmou vaječného žloutku (EYP) do praxe. Opravdu jsme ukázali, že je možné buňky MG-63 pěstovat v médiu s přídavkem EYP místo FBS. Nedosáhli jsme sice takových výsledků jako v případě kultivace ve standardním médiu obsahujícím FBS, ale i tak myslím si, že tato bakalářská práce může posloužit jako startovací bod pro další výzkumy ve snaze o nahrazení FBS.

SEZNAM LITERATURY

BIEBACK, Karen. Platelet lysate as replacement for fetal bovine serum in mesenchymal stromal cell cultures. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2013, roč. 40, č. 5, s. 326–335. ISSN 1660-3796. DOI: 10.1159/000354061.

DESSELS, Carla, Marnie POTGIETER a Michael S. PEPPER. Making the Switch: Alternatives to Fetal Bovine Serum for Adipose-Derived Stromal Cell Expansion. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2016, roč. 4, s. 115. ISSN 2296-634X. DOI: 10.3389/fcell.2016.00115.

GSTRAUNTHALER, Gerhard, 2003. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *ALTEX*. 2003, roč. 20, č. 4, s. 275–281.

HATINA, Jiří a KRIPNEROVÁ, Michaela, 2014. *Obecné zásady kultivace buněk v tkáňové kultuře*. Výukový portál Lékařské fakulty v Plzni. ISSN 1804-4409.

CHARBONNEAU, André M. a Simon D. TRAN. 3D Cell Culture of Human Salivary Glands Using Nature-Inspired Functional Biomaterials: The Egg Yolk Plasma and Egg White. *Materials*. 2020, roč. 13, č. 21, s. 4807. ISSN 1996-1944. DOI: 10.3390/ma13214807.

JOCHEMS, Carlo E. A., VAN DER VALK, Jan B. F., STAFLEU, Frans R. a BAUMANS, Vera, 2002. The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? Alternatives to laboratory animals. *ATLA*. 2002, roč. 30, č. 2, s. 219–227. DOI 10.1177/026119290203000208.

PILETZ, John E. et al. Human Cells Grown With or Without Substitutes for Fetal Bovine Serum. *Cell Medicine*. 2018, roč. 10, s. 2155179018755140. ISSN 2155-1790. DOI: 10.1177/2155179018755140.

SALÁKOVÁ, Alena, 2014. *Hygiena a technologie drůbeže, vajec a zvěřiny*. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. ISBN 978-80-7305-721-3.

SUBBIAHANADAR CHELLADURAI, Karthikeyan et al. Alternative to FBS in animal cell culture - An overview and future perspective. *Heliyon*. 2021, roč. 7, č. 8, s. e07686. ISSN 2405-8440. DOI: 10.1016/j.heliyon.2021.e07686.

ŠEBEK, Jaroslav, 2018. *Buněčné kultury v medicíně*. Galén. Praha. ISBN 978-80-7492-380-7

VAN DER VALK, Jan, BIEBACK, Karen, BUTA, Christiane, COCHRANE, Brett, DIRKS, Wilhelm G., FU, Jianan, HICKMAN, James J., HOHENSEE, Christiane, KOLAR, Roman, LIEBSCH, Manfred, PISTOLLATO, Francesca, SCHULZ, Markus, THIEME, Daniel, WEBER, Tilo, WIEST, Joachim, WINKLER, Stefan a STRAUNTHALER, Gerhard. Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX*. 2018, roč. 35, č. 1, s. 99–118. DOI 10.14573/altex.1705101.

WITZENEDER, Karin et al. Human-derived alternatives to fetal bovine serum in cell culture. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2013, roč. 40, č. 6, s. 417–423. ISSN 1660-3796. DOI: 10.1159/000356236.

YANG, Xianhong et al. A simple colorimetric method for viable bacteria detection based on cell counting Kit-8. *Analytical Methods: Advancing Methods and Applications*. 2021, roč. 13, č. 43, s. 5211–5215. ISSN 1759-9679. DOI: 10.1039/d1ay01624e.

SEZNAM PŘÍLOH

A – PŘÍBALOVÝ LETÁK

B – SLOŽENÍ MÉDIÍ

C – BEZPEČNOSTNÍ LIST

PŘÍLOHY

A- příbalový leták k buňkám MG-63



MG-63

CRL-1427™

Description

Organism: *Homo sapiens*, human

Tissue: Bone

Age: 14 years

Gender: Male

Morphology: fibroblast

Growth properties: Adherent

Disease: Osteosarcoma

Technical information: ATCC Technical Services does not have technical information on patent deposits that are not produced or characterized by ATCC. Additional information can be found in the corresponding patent available from the patent holder or with the U.S. and/or international patent office.

Storage Conditions

Product format: Frozen

Storage conditions: Vapor phase of liquid nitrogen

Intended Use

This product is intended for laboratory research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic use, any human or animal consumption, or any diagnostic use.



BSL 1

ATCC determines the biosafety level of a material based on our risk

MG-63
CRL-1427

Product Sheet

assessment as guided by the current edition of *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL)*, U.S. Department of Health and Human Services. It is your responsibility to understand the hazards associated with the material per your organization's policies and procedures as well as any other applicable regulations as enforced by your local or national agencies.

ATCC highly recommends that appropriate personal protective equipment is always used when handling vials. For cultures that require storage in liquid nitrogen, it is important to note that some vials may leak when submerged in liquid nitrogen and will slowly fill with liquid nitrogen. Upon thawing, the conversion of the liquid nitrogen back to its gas phase may result in the vial exploding or blowing off its cap with dangerous force creating flying debris. Unless necessary, ATCC recommends that these cultures be stored in the vapor phase of liquid nitrogen rather than submerged in liquid nitrogen.

Certificate of Analysis

For batch-specific test results, refer to the applicable certificate of analysis that can be found at www.atcc.org.

Growth Conditions

Temperature: 37°C

Atmosphere: 95% Air, 5% CO₂

Handling Procedures

Unpacking and storage instructions:

MG-63

CRL-1427

Product Sheet

1. Check all containers for leakage or breakage.
2. Remove the frozen cells from the dry ice packaging and immediately place the cells at a temperature below -130°C , preferably in liquid nitrogen vapor, until ready for use.

Complete medium: The base medium for this cell line is ATCC-formulated Eagle's Minimum Essential Medium, Catalog No. 30-2003. To make the complete growth medium, add the following components to the base medium: heat-inactivated fetal bovine serum to a final concentration of 10%.

Handling Procedure:

To insure the highest level of viability, thaw the vial and initiate the culture as soon as possible upon receipt. If upon arrival, continued storage of the frozen culture is necessary, it should be stored in liquid nitrogen vapor phase and not at -70°C . Storage at -70°C will result in loss of viability.

1. Thaw the vial by gentle agitation in a 37°C water bath. To reduce the possibility of contamination, keep the O-ring and cap out of the water. Thawing should be rapid (approximately 2 minutes).
2. Remove the vial from the water bath as soon as the contents are thawed, and decontaminate by dipping in or spraying with 70% ethanol. All of the operations from this point on should be carried out under strict aseptic conditions.
3. Transfer the vial contents to a centrifuge tube containing 9.0 mL complete culture medium and spin at approximately $125 \times g$ for 5 to 10 minutes.
4. Resuspend cell pellet with the recommended complete medium (see the specific batch information for the culture recommended dilution ratio) and dispense into a 25 cm^2 or a 75 cm^2 culture flask. It is important to avoid excessive alkalinity of the medium during recovery of the cells. It is suggested that, prior to the addition of the vial contents, the culture vessel containing the complete growth medium be placed into the incubator for at least 15 minutes to allow the medium to reach its normal pH (7.0 to 7.6).
5. Incubate the culture at 37°C in a suitable incubator. A 5% CO_2 in air atmosphere is recommended if using the medium described on this product sheet.

Subculturing procedure:

MG-63

CRL-1427

Product Sheet

Volumes are given for a 75 cm² flask. Increase or decrease the amount of dissociation medium needed proportionally for culture vessels of other sizes.

1. Remove and discard culture medium.
2. Briefly rinse the cell layer with 0.25% (w/v) Trypsin- 0.53 mM EDTA solution to remove all traces of serum that contains trypsin inhibitor.
3. Add 2.0 to 3.0 mL of Trypsin-EDTA solution to flask and observe cells under an inverted microscope until cell layer is dispersed (usually within 5 to 15 minutes).

Note: To avoid clumping do not agitate the cells by hitting or shaking the flask while waiting for the cells to detach. Cells that are difficult to detach may be placed at 37°C to facilitate dispersal.

4. Add 6.0 to 8.0 mL of complete growth medium and aspirate cells by gently pipetting.
5. Add appropriate aliquots of the cell suspension to new culture vessels.
6. Incubate cultures at 37°C.

Subcultivation Ratio: A subcultivation ratio of 1:4 to 1:8 is recommended

Medium Renewal: 2 to 3 times per week

Material Citation

If use of this material results in a scientific publication, please cite the material in the following manner: MG-63 (ATCC CRL-1427)

References

References and other information relating to this material are available at www.atcc.org.

Warranty

The product is provided 'AS IS' and the viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, provided that the customer has stored and handled the product according to the information

included on the product information sheet, website, and Certificate of Analysis. For living cultures, ATCC lists the media formulation and reagents that have been found to be effective for the product. While other unspecified media and reagents may also produce satisfactory results, a change in the ATCC and/or depositor-recommended protocols may affect the recovery, growth, and/or function of the product. If an alternative medium formulation or reagent is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid. Except as expressly set forth herein, no other warranties of any kind are provided, express or implied, including, but not limited to, any implied warranties of merchantability, fitness for a particular purpose, manufacture according to cGMP standards, typicality, safety, accuracy, and/or noninfringement.

Disclaimers

This product is intended for laboratory research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic use, any human or animal consumption, or any diagnostic use. Any proposed commercial use is prohibited without a license from ATCC.

While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate or complete and the customer bears the sole responsibility of confirming the accuracy and completeness of any such information.

This product is sent on the condition that the customer is responsible for and assumes all risk and responsibility in connection with the receipt, handling, storage, disposal, and use of the ATCC product including without limitation taking all appropriate safety and handling precautions to minimize health or environmental risk. As a condition of receiving the material, the customer agrees that any activity undertaken with the ATCC product and any progeny or modifications will be conducted in compliance with all applicable laws,

MG-63
CRL-1427

Product Sheet

regulations, and guidelines. This product is provided 'AS IS' with no representations or warranties whatsoever except as expressly set forth herein and in no event shall ATCC, its parents, subsidiaries, directors, officers, agents, employees, assigns, successors, and affiliates be liable for indirect, special, incidental, or consequential damages of any kind in connection with or arising out of the customer's use of the product. While reasonable effort is made to ensure authenticity and reliability of materials on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of such materials.

Please see the material transfer agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is available at www.atcc.org.

This material is cited in a US and/or international patent and may not be used to infringe the claims. Depending on the wishes of the Depositor, ATCC may be required to inform the Depositor of the party to which the material was furnished.

Copyright and Trademark Information

© ATCC 2021. All rights reserved.

ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection.

Revision

This information on this document was last updated on 2021-10-16

Contact Information

ATCC
10801 University Boulevard
Manassas, VA 20110-2209

MG-63

CRL-1427

USA

US telephone: 800-638-6597

Worldwide telephone: +1-703-365-2700

Fax number: 703-365-2701

Email: tech@atcc.org or contact your local distributor

Product Sheet

B- Složení médií

Nutriční složka	MEM (mg/l)	DMEM (mg/l)	Ham F12 (mg/l)	CMRL 1066 (mg/l)	RPMI 1640 (mg/l)	199 (mg/l)	L15 (mg/l)	Fischer (mg/l)	Waymouth MB752/1 (mg/l)
Aminokyseliny									
L-alanin	-	-	8,9	25	-	25	225	-	-
L-arginin (volná báze)	-	-	-	-	200	-	500	-	-
L-arginin HCl	126	84	211	70	-	70	-	15	75
L-asparagin	-	-	-	-	50	-	-	-	-
L-asparagin H ₂ O	-	-	15	-	-	-	260	11,4	-
L- asparagová kyselina	-	-	13,3	30	20	30	-	-	60
L-cystein (volná kys.)	-	-	-	-	-	-	120	-	61
L-cystin	24	48	-	20	50	-	-	-	15
L-cystin 2Na	-	-	-	-	-	23,7	-	23,7	-
L-cystein HCl H ₂ O	-	-	35,1	260	-	0,098	-	-	-
L-glutamová kyselina	-	-	14,7	75	20	66,8	-	-	150
L-glutamin	292	584	146	100	300	100	300	200	350
Glycin	-	30	7,5	50	10	50	200	-	50
L-histidin (volná báze)	-	-	-	-	15	-	250	-	128
L-histidin HCl H ₂ O	42	42	21	20	-	21,9	-	81,1	-
L- hydroxyprolin	-	-	-	10	20	10	-	-	-
L-izoleucin	52	105	3,94	20	50	20	125	75	25
L-leucin	52	105	13,1	60	50	60	125	30	50
L-lyzin HCl	73,1	146	36,5	70	40	70	93	50	240
L-methionin	15	30	4,48	15	15	15	75	100	50
L-fenylalan.	33	66	4,96	25	15	25	125	67	50
L-prolin	-	-	34,5	40	20	40	-	-	50
L-serin	-	42	10,5	25	30	25	200	15	-
L-threonin	48	95	11,9	30	20	30	300	40	75
L-tryptofan	10	16	2,04	10	5	10	20	10	40
L-tyrozin	36	72	5,4	40	20	-	-	-	40
L-tyrozin 2Na	-	-	-	-	-	49,7	373	74,6	-
L-valin	47	94	11,7	25	20	25	100	70	65
Vitaminy									
L-askorbová kyselina	-	-	-	50	-	0,05	-	-	17,5
Biotin	-	-	0,007	0,01	0,2	0,01	-	0,01	0,02
D-Ca panthotenát	1,0	4,0	0,48	0,01	0,25	0,01	1,0	0,5	1,0
Kalciferol	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-
Cholin chlorid	1,0	4,0	14	0,5	3,0	0,5	1,0	1,5	250
Kysel. listová	1,0	4,0	1,3	0,01	1,0	0,01	1,0	10	0,4
i-inositol	2,0	7,2	18	0,05	35	0,05	2,0	1,5	1,0
Nutriční složka	MEM (mg/l)	DMEM (mg/l)	Ham F12 (mg/l)	CMRL 1066 (mg/l)	RPMI 1640 (mg/l)	199 (mg/l)	L15 (mg/l)	Fischer (mg/l)	Waymouth MB752/1 (mg/l)
Nikotinamid	1,0	4,0	0,04	0,025	1,0	0,025	1,0	0,5	1,0
Pyridoxal HCl	1,0	4,0	0,062	0,025	-	0,025	-	0,5	-
Riboflavin	0,1	0,4	0,038	0,01	0,2	0,01	-	0,5	1,0

Nutriční složka	MEM (mg/l)	DMEM (mg/l)	Ham F12 (mg/l)	CMRL 1066 (mg/l)	RPMI 1640 (mg/l)	199 (mg/l)	L15 (mg/l)	Fischer (mg/l)	Waymouth MB752/1 (mg/l)
Thiamin HCl	1,0	4,0	0,34	0,01	1,0	0,01	-	1,0	10
Vitamin B12	-	-	1,36	-	0,005	-	-	-	0,2
Pyridoxin HCl	-	-	0,062	0,025	1,0	0,025	-	-	1,0
Cholesterol	-	-	-	0,2	-	0,2	-	-	-
Kyselina paraaminobenzoová	-	-	-	0,05	1,0	0,05	-	-	-
Kysel. nikotinová	-	-	-	-	-	0,025	-	-	-
Menafton Na bisulfid .3H ₂ O	-	-	-	-	-	0,019	-	-	-
DI-tokoferol PO ₄ . 2 Na	-	-	-	-	-	0,01	-	-	-
Vitamin A acetát	-	-	-	-	-	0,115	-	-	-
Riboflavin PO ₄ 2Na	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-
Thiamin mono fosfát .2H ₂ O	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-
Anorganické soli									
CaCl ₂ (bezv.)	200	200	-	200	-	-	-	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	-	44	-	-	186	186	91	120
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-
KCl	400	400	224	400	400	400	400	400	150
KH ₂ PO ₄	-	-	-	-	-	60	60	-	80
MgCl ₂ .6H ₂ O	-	-	122	-	-	-	-	-	240
MgSO ₄ .7H ₂ O	200	200	-	200	100	200	400	121	200
NaCl	6800	6400	7599	6799	6000	8000	8000	8000	6000
NaHCO ₃	2200	3700	1176	2200	2200	350	-	1125	2240
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	140	125	-	140	-	-	-	78	-
Na ₂ HPO ₄ (bezv.)	-	-	-	-	-	47,5	190	60	-
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	-	-	268	-	1512	-	-	-	566
CuSO ₄ .5H ₂ O	-	-	0,0025	-	-	-	-	-	-
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	-	0,834	-	-	-	-	-	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-	-	0,863	-	-	-	-	-	-
Další komponenty									
D-glukóza	1000	4500	1802	1000	2000	1000	-	1000	5000
D-galaktóza	-	-	-	-	-	-	9000	-	-
Lipoová kys.	-	-	0,21	-	-	-	-	-	-
Fenolová červeň	10	15	12	20	5,0	17	10	5,0	10
Pyruvát sodný	-	110	110	-	-	-	550	-	-
Hypoxantin	-	-	4,1	-	-	0,3	-	-	-
Linoeová kysel.	-	0,084	-	-	-	-	-	-	25
Putrescin 2HCl	-	-	0,161	-	-	-	-	-	-
Tymidin	-	-	0,73	10	-	-	-	-	-
Kokarboxyláza	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-
Koenzym A	-	-	-	2,5	-	-	-	-	-
Deoxyadenosi	-	-	-	10	-	-	-	-	-

Nutriční složka	MEM (mg/l)	DMEM (mg/l)	Ham F12 (mg/l)	CMRL 1066 (mg/l)	RPMI 1640 (mg/l)	199 (mg/l)	L15 (mg/l)	Fischer (mg/l)	Waymouth MB752/1 (mg/l)
n									
Deoxycytidin HCl	-	-	-	10	-	-	-	-	-
Deoxyguanosi n	-	-	-	10	-	-	-	-	-
Difosfopyridinnukleotid .4H ₂ O	-	-	-	7,0	-	-	-	-	-
Etanol (solubilizace lipidů)	-	-	-	16	-	-	-	-	-
Flavinadenin dinukleotid	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-
Glutation (redukov.)	-	-	-	10	1,0	0,05	-	-	15
5-metyl-deoxycytidin	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-
Acetát sodný .3H ₂ O	-	-	-	83	-	-	-	-	-
Glukonát sodný .H ₂ O	-	-	-	4,2	-	-	-	-	-
Trifosfopyridin nukleotid	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-
Tween 8	-	-	-	5,0	-	5,0	-	-	-
Uridin trifosfát .4H ₂ O	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-
Adenin SO ₄	-	-	-	-	-	10	-	-	-
5'AMP	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-
ATP-2Na	-	-	-	-	-	10	-	-	-
2-deoxyribóza	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-
Guanin HCl	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-
D-ribóza	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-
Na acetát	-	-	-	-	-	36,7	-	-	-
Tymin	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-
Uracil	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-
Xantin	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-
CO ₂ (plynná fáze)	5%	10%	5% - (pH 7) 2% - (pH 7,4)	5%	5%	okolní vzduch	okolní vzduch	5% - (pH 7) 2% - (pH 7,4)	5%

BEZPEČNOSTNÍ LIST

podle Nařízení (ES) č. 453/2010

Verze 8.8
Datum revize 10.02.2022
Datum vytištění 28.03.2022

ODDÍL 1: Identifikace látky/směsi a společnosti/podniku

1.1 Identifikátory výrobku

Název výrobku : Fetal Bovine Serum, US Origin

Číslo produktu: : TMS-013

Katalog č. : 6D1940

Značka : Millipore

č. REACH : Registrační číslo není pro tuto látku k dispozici, protože tato látka a její použití nepodléhá registraci, roční objem nevyžaduje registraci nebo se registrace předpokládá později.

1.2 Příslušná určená použití látky nebo směsi a nedoporučená použití

Určená použití : Biochemický výzkum/analýza

1.3 Podrobné údaje o dodavateli bezpečnostního listu

Firma : Merck Life Science spol. s r. o.
Na Hřebenech II 1718/10
CZ-140 00 PRAGUE

Telefon : +420 246 003-251

E-mailová adresa : TechnicalService@merckgroup.com

1.4 Telefonní číslo pro naléhavé situace

Číslo nouzového telefonu : +420 228880039(CHEMTREC)
+420 224919293/224915402
(Toxikologické informační středisko)

ODDÍL 2: Identifikace nebezpečnosti

2.1 Klasifikace látky nebo směsi

Podle směrnice (ES) č. 1272/2008 není nebezpečnou látkou ani směsí.

2.2 Prvky označení

Podle směrnice (ES) č. 1272/2008 není nebezpečnou látkou ani směsí.

2.3 jiná rizika

Látka/směs neobsahuje složky považované buď za perzistentní, bioakumulativní a toxické (PBT), nebo za vysoce perzistentní a vysoce bioakumulativní (vPvB) v koncentraci 0,1 % či vyšší.

ODDÍL 3: Složení/informace o složkách**3.1 Látky**

Podle platných předpisů není potřeba uvádět jednotlivé složky.

ODDÍL 4: Pokyny pro první pomoc**4.1 Popis první pomoci****Při vdechnutí**

Po nadýchání: přejděte na čerstvý vzduch.

Při styku s kůží

Při styku s kůží: Veškeré kontaminované části oděvu okamžitě svlékněte. Opláchněte kůži vodou/ osprchujte.

Při styku s očima

Po zasažení očí: vypláchněte velkým množstvím vody. Odstraňte kontaktní čočky.

Při požití

Po požití: nechejte postiženého vypít vodu (nejvýše dvě sklenice). V případě nevolnosti vyhledejte lékaře.

4.2 Nejdůležitější akutní a opožděné symptomy a účinky

Nejdůležitější známé symptomy a účinky jsou popsány na štítku (viz sekce 2.2) a/nebo v sekci 11

4.3 Pokyn týkající se okamžité lékařské pomoci a zvláštního ošetření

Údaje nejsou k dispozici

ODDÍL 5: Opatření pro hašení požáru**5.1 Hasiva****Vhodná hasiva**

Opatření při požáru mají odpovídat okolním podmínkám.

Nevhodná hasiva

Pro tuto látku/směs neplatí žádné omezení hasiv.

5.2 Zvláštní nebezpečnost vyplývající z látky nebo směsi

Struktura produktů rozkladu není známa.

Nehořlavá látka.

Při hoření může uvolňovat nebezpečné výpary.

5.3 Pokyny pro hasiče

Při požáru použijte izolační dýchací přístroj.

5.4 Další informace

Zabraňte kontaminaci systému povrchových nebo podzemních vod vodou použitou k hašení požáru.

ODDÍL 6: Opatření v případě náhodného úniku**6.1 Opatření na ochranu osob, ochranné prostředky a nouzové postupy**

Pokyny pro pracovníky kromě pracovníků zasahujících v případě nouze Nevdechujte páry/aerosol. Vykliďte zasaženou oblast, postupujte dle nařízení pro nouzové situace, kontaktujte odborného poradce.

Osobní ochrana viz sekce 8.

6.2 Opatření na ochranu životního prostředí

Nenechejte vniknout do kanalizace.

6.3 Metody a materiál pro omezení úniku a pro čištění

Zakryjte kanalizační vpusť. Rozlitý přípravek posbírejte, zavažte a zbytek vysajte čerpadlem. Dodržujte pokyny (viz. Sekce 7 a 10) týkající se možného omezení materiálu. Vysušte sorbentem kapalin (např. Chemisorb®). Předejte k likvidaci. Očistěte potřísněné plochy.

6.4 Odkaz na jiné oddíly

Zneškodnit podle kapitoly 13.

ODDÍL 7: Zacházení a skladování

7.1 Opatření pro bezpečné zacházení

Prevence viz sekce 2.2.

7.2 Podmínky pro bezpečné skladování látek a směsí včetně neslučitelných látek a směsí

Skladovací podmínky

Těsně uzavřené.

Doporučená skladovací teplota, viz výrobní štítek.

Třída skladování

Německá třída skladování (TRGS 510): 10: Hořlavé kapaliny

7.3 Specifické konečné / specifická konečná použití

Část použití zmíněných v sekci 1.2 žádná další použití nejsou vyhrazena.

ODDÍL 8: Omezování expozice / osobní ochranné prostředky

8.1 Kontrolní parametry

Složky s parametry pro kontrolu pracoviště

Neobsahuje žádné látky s mezními hodnotami expozice na pracovišti.

8.2 Omezování expozice

Osobní ochranné prostředky

Ochrana očí a obličeje

Použijte zařízení na ochranu očí testované a schválené příslušnými státními normami jako NIOSH (US) nebo EN 166(EU). Ochranné brýle

Ochrana kůže

není požadováno

Ochrana dýchacích cest

Není vyžadováno s výjimkou tvorby aerosolu.

Kontrola zatížení životního prostředí

Nenechejte vniknout do kanalizace.

ODDÍL 9: Fyzikální a chemické vlastnosti**9.1 Informace o základních fyzikálních a chemických vlastnostech**

a) Vzhled	Forma: kapalný Barva: bezbarvý
b) Zápach	Údaje nejsou k dispozici
c) Prahová hodnota zápachu	Údaje nejsou k dispozici
d) pH	Údaje nejsou k dispozici
e) Bod tání / bod tuhnutí	Údaje nejsou k dispozici
f) Počáteční bod varu a rozmezí bodu varu	Údaje nejsou k dispozici
g) Bod vzplanutí	Údaje nejsou k dispozici
h) Rychlost odpařování	Údaje nejsou k dispozici
i) Hořlavost (pevné látky, plyny)	Údaje nejsou k dispozici
j) Horní/dolní meze zápalnosti nebo meze výbušnosti	Údaje nejsou k dispozici
k) Tlak páry	Údaje nejsou k dispozici
l) Hustota páry	Údaje nejsou k dispozici
m) Hustota	Údaje nejsou k dispozici
Relativní hustota	Údaje nejsou k dispozici
n) Rozpustnost ve vodě	rozpustná látka
o) Rozdělovací koeficient: n-oktanol/voda	Údaje nejsou k dispozici
p) Teplota samovznícení	Údaje nejsou k dispozici
q) Teplota rozkladu	Údaje nejsou k dispozici
r) Viskozita	Kinematická viskozita: Údaje nejsou k dispozici Dynamická viskozita: Údaje nejsou k dispozici
s) Výbušné vlastnosti	Údaje nejsou k dispozici
t) Oxidační vlastnosti	žádné

9.2 Další bezpečnostní informace.

Údaje nejsou k dispozici

ODDÍL 10: Stálost a reaktivita**10.1 Reaktivita**

Údaje nejsou k dispozici

10.2 Chemická stabilita

Tento produkt je stabilní při teplotě okolního prostředí (pokojová teplota).

10.3 Možnost nebezpečných reakcí

Údaje nejsou k dispozici

10.4 Podmínky, kterým je třeba zabránit

informace nejsou k dispozici

10.5 Neslučitelné materiály

Silná oxidační činidla

10.6 Nebezpečné produkty rozkladu

V případě požáru: viz sekce 5

ODDÍL 11: Toxikologické informace

11.1 Informace o toxikologických účincích

Akutní toxicita

Orálně: Údaje nejsou k dispozici

Vdechnutí: Údaje nejsou k dispozici

Kožní: Údaje nejsou k dispozici

Žíravost/dráždivost pro kůži

Údaje nejsou k dispozici

Vážné poškození očí / podráždění očí

Údaje nejsou k dispozici

Senzibilizace dýchacích cest / senzibilizace kůže

Údaje nejsou k dispozici

Mutagenita v zárodečných buňkách

Údaje nejsou k dispozici

Karcinogenita

Údaje nejsou k dispozici

Toxicita pro reprodukci

Údaje nejsou k dispozici

Toxicita pro specifické cílové orgány - jednorázová expozice

Údaje nejsou k dispozici

Toxicita pro specifické cílové orgány - opakovaná expozice

Údaje nejsou k dispozici

Nebezpečnost při vdechnutí

Údaje nejsou k dispozici

11.2 Další informace

Dle našich nejlepších znalostí nebyly chemické, fyzikální a toxikologické vlastnosti úplně prozkoumány.

ODDÍL 12: Ekologické informace

12.1 Toxicita

Údaje nejsou k dispozici

12.2 Perzistence a rozložitelnost

Údaje nejsou k dispozici

15.2 Posouzení chemické bezpečnosti

Pro tento produkt nebylo prováděno hodnocení chemické bezpečnosti.

ODDÍL 16: Další informace

Další informace

Předpokládá se, že výše uvedené informace jsou správné. Neznamená to však, že jsou kompletní a měly by sloužit jen jako vodítko. Společnost Sigma-Aldrich Co. a její dceřinné společnosti nenesou zodpovědnost za škody způsobené manipulací nebo stykem s uvedenými chemikáliemi. Proto Vás žádáme, abyste se řídili obchodními podmínkami uvedenými na stránkách www.sigma-aldrich.com a/nebo na zadní straně faktur a příbalových letáků.

Copyright 2020 Sigma-Aldrich Co. LLC. Licence poskytnuta k výrobě libovolného množství papírových kopií pro vnitřní použití.

Vzhled značky v záhlaví anebo zápatí tohoto dokumentu se nemusí dočasně shodovat se značkou na zakoupeném produktu, protože v současné době probíhá změna naší značky. Nicméně všechny informace v dokumentu týkající se výrobku zůstávají beze změny a shodují se s objednaným výrobkem. Více informací si můžete vyžádat na e-mailu: mlsbranding@sial.com.